

UNTERSUCHUNGEN ZUR GENREGULATION ANHAND VERGLEICHENDER TRANSKRIPTOM-PROTEOM ANALYSEN UND PROMOTORSTUDIEN IM MAUSMODELL

Dem Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte

D i s s e r t a t i o n

**von Tomasz Mijalski
aus Stawiszyn**

- 1. Referent: Prof. Balling**
- 2. Referent: Prof. Jahn**

eingereicht am: 06.09.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.12.2005

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Identification of coexpressed gene clusters in a comparative analysis of transcriptome and proteome in mouse tissues. Mijalski T, Harder A, Halder T, Kersten M, Horsch M, Strom TM, Liebscher HV, Lottspeich F, de Angelis MH, Beckers J. Proc Natl Acad Sci (PNAS) USA. 2005 Jun 14;102(24):8621-6. Epub 2005 Jun 6.

Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. Gailus-Durner V, Fuchs H, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, Elvert R, Ehrhardt N, Dalke C, Franz TJ, Grundner-Culemann E, Hammelbacher S, Holter SM, Holzlwimmer G, Horsch M, Javaheri A, Kalaydjiev SV, Klempt M, Kling E, Kunder S, Lengger C, Lisse T, Mijalski T, Naton B, Pedersen V, Prehn C, Przemeck G, Racz I, Reinhard C, Reitmeir P, Schneider I, Schrewe A, Steinkamp R, Zybill C, Adamski J, Beckers J, Behrendt H, Favor J, Graw J, Heldmaier G, Hofler H, Ivandic B, Katus H, Kirchhof P, Klingenspor M, Klopstock T, Lengeling A, Muller W, Ohl F, Ollert M, Quintanilla-Martinez L, Schmidt J, Schulz H, Wolf E, Wurst W, Zimmer A, Busch DH, de Angelis MH. Nature Methods. 2005 Jun;2(6):403-4.

ZUSAMMENFASSUNG 5

EINLEITUNG 8

VON DER KENNTNIS DER DNA-SEQUENZ ZU NEUEN METHODEN DER FUNKTIONSANALYSE VON GENEN	8
DAS GENOM UND DIE KOMPLEXITÄT DES ORGANISMUS	9
DAS TRANSKRIPTOM	9
DAS PROTEOM	10
KOMPLEXITÄT DURCH VARIABILITÄT	10

A DIE ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS 12

DIE DNA-CHIPTECHNOLOGIE	13
ANFORDERUNG AN DIE DNA-CHIPTECHNOLOGIE	14
ANSPRUCH AN DIE QUALITÄT DER DNA-CHIPTECHNOLOGIE	15
DNA-CHIPTECHNOLOGIE ZUR UNTERSUCHUNG UNTERSCHIEDLICHER BIOLOGISCHER FRAGESTELLUNGEN	16
A.1 RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON MAUSEMBRYONEN MIT INAKTIVIERTEM GEN: DIE DLL1-KNOCK-OUT-MAUS	17
A.1.1 Der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg	17
A.1.2 Komponenten des Delta-Notch-Signaltransduktionsweges	18
A.2 RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON MAUSGEHIRNEN MIT EINEM GEWEBESPEZIFISCH INAKTIVIERTEN GEN: DIE THIOREDOXINREDUKTASE 1-KNOCK-OUT-MAUS	20
A.2.1 Das Thioredoxin-Redox-System	20
A.2.2 Die Familie von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase	21
A.2.3 Analyse der Genfunktion von Txnrd1	21
A.3 RNA-EXPRESSIONSANALYSE AM GEWEBE ZWEIER MAUSSTÄMME, ANHAND DES VERGLEICHES DES THYMUS DER MAUSSTÄMME C3HeB/FeJ UND C57BL/6J	22
A.3.1 Die German Mouse Clinic	22
A.4 RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON GEHIRNEN VON MÄUSEN, DIE MIT DEM NAHRUNGSERGÄNZUNGSMITTEL CREATIN SUPPLEMENTIERT WURDEN	24
A.4.1 Das Creatin/Creatin-Phosphat-System und dessen Funktion in der Zelle	24

B VERGLEICHENDE ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS UND PROTEOMS 25

B.1 DIE ANALYSE DES PROTEOMS	26
B.1.1 Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie	26
B.1.2 Funktionsweise der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie	27
B.1.3 Die Grenzen der 2D-Gelelektrophorese	29

C CHROMOSOMALE CO-LOKALISATION VON DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENEN 29

C.1 GENREGULATION DURCH ANORDNUNG VON GENEN IN GENCLUSTERN	29
C.2 GENREGULATION AM BEISPIEL DES APO-GENCLUSTERS	30
C.3 GENREGULATION DURCH NICHT KODIERENDE KONSERVIERTE ELEMENTE	30

D ANALYSE DER GENREGULATION IN DER PROMOTORREGION AM BEISPIEL VON *DLL1* 32

D.1 DAS DLL1-GEN IN DER MAUS	32
D.2 DER PROMOTORBEREICH VON DLL1	32

E ZIEL DIESER ARBEIT 34

MATERIAL UND METHODEN 37

MATERIAL 37

Puffer und Lösungen	37
Chemikalien und Reagenzien	38
Enzyme	39
Labora Ausstattung	39
Labor-Kit-Systeme	39
Software	39
Datenbanken/Internetreferenzen	40

Kompetente Zellen	40
Mauslinien	40
Mausgewebe	40
Oligonukleotide	40
METHODEN	43
DNA-CHIPTECHNOLOGIE	43
Das Klonset	43
Fluoreszierende Farbstoffe (Dyes)	43
Isolierung, Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA	43
Markierungsprozedur des Targets	44
Aufreinigung von cDNA (Qiagen QIAquick Nucleotide Removal-Kit)	44
Markierung der cDNA mit Cy3 und Cy5 (Test-cDNA)	44
Aufreinigung von markierter cDNA (Qiagen QIAquick Nucleotide Removal-Kit)	45
Prähybridisierung und Hybridisierung des DNA-Chips	45
Waschschritte	45
Bild-Analyse	46
Normalisierung	46
Statistische Analyse	46
ISOLIERUNG VON PROTEINEN	46
Probenpräparation für die 2D-Gelelektrophorese	46
2D-Gelelektrophorese	47
Gelfärbung und Spot-Quantifizierung	47
Peptid-Massenspektroskopie (PMF MALDI-TOF)	48
ALLGEMEINE METHODEN ZUR ARBEIT MIT PROKARYONTEN (E. COLI)	48
Transformation chemisch kompetenter Zellen	48
Transformation elektrokompenter Zellen	49
Klonierung mit dem Topo-TA-Cloning-Kit (Invitrogen)	49
Charakterisierung der transformierten Bakterien (Blau-Weiß-Selektion)	50
Lagerung von Bakterien	50
Plasmid Mini-Präparation	50
Plasmid Midi- bzw. Maxi-Präparation	51
ARBEITSTECHNIKEN AUF DER BASIS VON NUKLEINSÄUREN	51
Isolierung von Gesamt-RNA mittels RNeasy Kit	51
Denaturierende RNA-Gel-Elektrophorese	51
Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)	52
Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	52
Echtzeit-PCR (RealTime-PCR)	53
cDNA Aufreinigung	53
Konzentrationsbestimmung und Beurteilung der Reinheit von Nukleinsäuren	54
Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	54
DNA-Präzipitation	55
DNA-Agarosegel-Elektrophorese	55
Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	56
Ligation von DNA	56
Dephosphorylierung des Vektors	56
Ligation überhängender DNA-Enden	57
Ligation kohesiver DNA-Enden	57
Amplifikation von DNA mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)	57
TECHNIKEN ZUR ANALYSE VON MAUSEMBRYONEN	58
Präparation von Mausembryonen	58
Genotypisierung	58
GANZKÖRPER-IN SITU-HYBRIDISIERUNG	59
Herstellung von RNA in situ Proben	61

ERGEBNISSE 62

A DIE ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS	62
A.1 DNA-CHIPTECHNOLOGIE	63
A.1.1 LabView-basierendes Analyseprogramm	63
A.2 RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON MAUSEMBRYONEN MIT INAKTIVIERTEM GEN: DIE DLL1-KNOCK-OUT-MAUS	66
A.2.1 Verifizierung der RNA-Expressionsdaten mit Hilfe der RT-PCR	68
A.2.2 Verifizierung der RNA-Expressionsdaten mit Hilfe der Echtzeit-PCR	69

A.2.3	Expression von differentiell regulierten Transkripten an Ganzkörper-in situ-Hybridisierungen	74
A.3	RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON MAUSGEHIRNEN MIT GEWEBESPEZIFISCH INAKTIVIERTEM GEN: DIE THIOREDOXINREDUKTASE 1-KNOCK-OUT-MAUS	77
A.4	RNA-EXPRESSIONSANALYSE AM GEWEBE ZWEIER MAUSSTÄMME, ANHAND DES VERGLEICHES DES THYMUS DER MAUSSTÄMME C3HeB/FeJ UND C57BL/6J	79
A.5	RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON GEHIRNEN MIT CREATIN BEHANDELTER MÄUSE	82
B	VERGLEICHENDE ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS UND PROTEOMS ON LEBER UND NIERE IN DER MAUS	83
B.1	DIFFERENTIELLES TRANSKRIPTOM VON LEBER UND NIERE IN DER MAUS	84
B.2	DIFFERENTIELLES PROTEOM VON LEBER UND NIERE IN DER MAUS	87
B.3	FUNKTIONEN VON LEBER- UND NIERENSPEZIFISCHEN TRANSKRIPTEN UND PROTEINEN	90
B.4	VERGLEICHENDE ANALYSE VON DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN TRANSKRIPTEN UND PROTEINEN	92
C	CHROMOSOMALE CO-LOKALISATION VON DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENEN IN LEBER- UND NIERENGeweBE DER MAUS	95
D	ANALYSE DER PROMOTORREGION DES <i>DLL1</i>-GENS IN TRANSGENEN MÄUSEN	98

DISKUSSION

103

A	DIE ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS	103
A.1	RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON MAUSEMBRYONEN MIT INAKTIVIERTEM GEN: DIE <i>DLL1</i> -KNOCK-OUT-MAUS	103
A.2	RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON MAUSGEHIRNEN MIT GEWEBESPEZIFISCH INAKTIVIERTEM GEN: DIE THIOREDOXINREDUKTASE 1-KNOCK-OUT-MAUS	107
A.3	RNA-EXPRESSIONSANALYSE VOM GEWEBE ZWEIER MAUSSTÄMME, ANHAND DES VERGLEICHES DES THYMUS DER MAUSSTÄMME C3HeB/FeJ UND C57BL/6J	109
A.4	RNA-EXPRESSIONSANALYSE VON GEHIRNEN MIT CREATIN BEHANDELTER MÄUSE	111
A.5	EINFLUSS AUF DIE DNA-CHIPANALYSE	112
A.6	DNA-CHIPTECHNOLOGIE ALS METHODE TRANSKRIPTOME DARZUSTELLEN	113
B	VERGLEICHENDE ANALYSE DES TRANSKRIPTOMS UND PROTEOMS VON LEBER UND NIERE IN DER MAUS	114
B.1	FUNKTIONEN VON TRANSKRIPTEN UND PROTEINEN	114
B.2	TRANSKRIPTIONELLE UND TRANSLATIONELLE REGULATION	115
C	CHROMOSOMALE CO-LOKALISATION VON DIFFERENTIELL EXPRIMIERTEN GENEN IN LEBER- UND NIERENGeweBE DER MAUS	117
C.1	IDENTIFIZIERUNG VON CHROMOSOMALEN REGIONEN CO-EXPRIMIERTER GENE	117
C.2	ZUSAMMENHANG ZWISCHEN CHROMOSOMALER LOKALISATION UND CO-EXPRESSION	118
D	ANALYSE DER PROMOTORREGION DES <i>DLL1</i>-GENS IN TRANSGENEN MÄUSEN	119
D.1	REGULATION DES <i>DLL1</i> -GENS	119
D.2	ERSTELLUNG VON <i>DLL1</i> -PROMOTOR-DELETIONSMUTANTEN	120

AUSBLICK

121

LITERATUR

123

ANHANG

138

TABELLEN	138
SEQUENZEN	144

ZUSAMMENFASSUNG

Ein großer Vorteil des Mausmodellsystems innerhalb der Klasse der Säugetiere liegt sowohl in der zunehmenden Vervollständigung dessen Genoms, Transkriptoms und Proteoms als auch in der Verfügbarkeit von Tieren kurzer Generationszeit mit mutierten und genetisch veränderten Allelen. Die vollständige Sequenzierung des Genoms der Maus vor ein paar Jahren hat die Voraussetzung für neue experimentelle Ansätze geschaffen, wie die systematische Identifizierung und funktionelle Charakterisierung nahezu sämtlicher Transkripte (die Transkriptomanalyse) und der daraus gebildeten Proteine (die Proteomanalyse) eines Zelltyps, Körperorgans oder Organismus.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der RNA-Expressionsanalyse mittels DNA-Chiptechnologie im Mausmodell sowohl eine ausreichend umfangreiche als auch prinzipiell erfolgreiche Studie der Genexpression in unterschiedlichen biologischen Fragestellungen möglich ist. Anhand der *Delta 1- (Dl1; delta-like 1) knock-out*-Mutante wurde in einer aufwändigen Verifikationsstudie mit anderen etablierten Methoden, wie der RT-PCR und Echtzeit-PCR, das Ergebnis der RNA-Expressionsprofilanalyse für die ausgewählten Kandidatengene zu 100 % bestätigt und damit gezeigt, dass die mit dieser Methode erhaltenen Daten verlässlich sind.

Weiterhin konnte ein funktioneller Zusammenhang zwischen den differentiell exprimierten Genen und den untersuchten Mausmodellen hergestellt werden. Beispielsweise wurden in der homozygoten *Dl1*-Mutante an Tag 11,5 *p. c.* eine Gruppe von sechs hoch-regulierten Genen identifiziert, die durch Hypoxia (Sauerstoffmangel des Gewebes) induziert werden – ein Zustand, der in sterbenden homozygoten *Dl1*-Embryonen zwischen Tag 11,5 bis 12,5 *p. c.* tatsächlich vorzufinden ist.

Am Beispiel des gewebespezifischen, auf neuronale Vorläuferzellen (Nestin-positive Zellen) beschränkten, konditionalen *Txnrd1-knock-out* konnte das runter-regulierte Gen *Zic1* identifiziert werden, welches nicht nur wie *Txnrd1* im Cerebellum exprimiert wird, sondern dessen Fehlen auch die gleichen funktionellen Störungen (Ataxie und cerebellare Hypoplasie) wie in *Txnrd1-knock-out*-Tieren zur Folge hat. Weiterhin zeigte eine vergleichende RNA-Expressionsprofilstudie von zwei Mausstämmen, C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6), eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen deren Funktionen im engen Zusammenhang zu den Ergebnissen der pathologischen Analysen stehen. Beispielsweise wurde das Gen *Pss16*, welches eine Rolle bei der Auswahl von T-Zellen spielt, mit dieser Methode identifiziert. Anomale Veränderungen in der positiven Selektion von T-Zellen wurden erst kürzlich mit der

Pathogenese von Diabetes in Verbindung gebracht, eine Krankheit, die auch in den untersuchten C3H-Tieren festgestellt wurde. Die Grenzen der Sensitivität der Methode der DNA-Chipanalyse konnten für den gewählten experimentellen Ansatz anhand des Beispiels der Creatin-Supplementierung aufgezeigt werden, da die Veränderungen des Transkriptoms des Gehirns der mit Creatin-behandelten Tiere offensichtlich so gering waren, dass sie mit dieser Methode nicht detektiert werden konnten.

Bislang ist wenig über die Verbindung von transkriptioneller und *post*-transkriptioneller Regulation der Genexpression bekannt. Im Speziellen sind Ergebnisse von umfassenden vergleichenden Transkriptom- und Proteomanalysen in dem Modellorganismus Maus sehr beschränkt.

Innerhalb dieser Arbeit wurden daher auf DNA-Chip-basierende RNA-Expressionsprofile und 2D-Gelelektrophorese in Kombination mit Massenspektroskopie von Proteinen aus Leber- und Nierenextrakten der Maus verwendet, um die generelle Durchführbarkeit einer solchen vergleichenden Genexpressionsanalyse zu testen. Obwohl die Proteinanalysen meistens bekannte metabolische Enzyme und Strukturproteine in diesen Geweben identifizierten, zeigten die Transkriptomanalysen die differentielle Expression von funktionell verschiedenen Genen und zusätzlich, eine signifikante Anzahl von Genen, welche funktionell noch nicht beschrieben sind. Die vergleichende Analyse der am stärksten differentiell exprimierten Proteine und deren korrespondierender Transkripte deutete auf eine Korrelation zwischen transkriptioneller und translationeller Expression für die Mehrzahl der Gene hin.

Bedeutende Ausnahmen von dieser Korrelation bestätigten die Komplementarität beider Untersuchungsansätze. Basierend auf den RNA-Expressionsdaten der 200 am stärksten differentiell zwischen Leber und Niere exprimierten Gene wurde die chromosomale Co-Lokalisation von bekannten und bislang noch nicht beschriebenen Genclustern identifiziert und festgestellt, dass die räumliche Organisation und evolutionäre Konservierung von solchen Genclustern möglicherweise auf gemeinsame genregulatorische Funktionen schließen lässt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde des Weiteren die RNA-Expressionsanalyse mittels DNA-Chiptechnologie in Kombination mit klassischen *in vivo*-Experimenten dazu verwendet, die Regulation von *Dll1* sowohl *upstream* als auch *downstream* näher zu verstehen und neue Zielgene von *Dll1* zu identifizieren. Um die Regulation von *Dll1 upstream* zu analysieren, wurden verschiedene Konstrukte eines mesodermalen (MSD)-Promotorelements des *Dll1*-Gens erstellt und transgene Tiere generiert (Deletionsstudien). Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Konstrukte an die Nachkommen weiter gegeben werden. Weitere

Experimente sollen Veränderungen im Expressionsmuster von *DIII* detektieren, um daraus Rückschlüsse auf die Regulation des *DIII*-Gens ziehen zu können.

EINLEITUNG

Von der Kenntnis der DNA-Sequenz zu neuen Methoden der Funktionsanalyse von Genen

Die letzten 5 bis 10 Jahre waren von spektakulären Leistungen auf dem Gebiet der Genomsequenzierung geprägt. Die vollständige Sequenzierung der ersten ca. 150 Genome, z.B. das des Menschen im Februar 2001 (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) und kurze Zeit später, das der Maus (Nadeau et al., 2001) hat neue Möglichkeiten eröffnet, die Funktion von Genen und deren Regulation zu analysieren.

Das Forschungsgebiet *functional genomics* integriert die Daten der umfassenden Genomanalysen mit funktionellen Studien entweder einzelner Gene oder in systematischen Ansätzen. Eine Möglichkeit der Funktionsanalyse von Genen ist die Generierung von Mausmutanten mit einem Defekt oder der Deletion eines Gens und der anschließenden Analyse des resultierenden *loss-of-function*-Phänotyps. Es gibt verschiedene Möglichkeiten Mausmutanten zu erzeugen: entweder werden bedeutende Elemente eines Gens (z. B. Exons) durch homologe Rekombination in ES-Zelle der Maus entfernt und ein so genanntes *knock-out*-Modell erstellt, oder ein zusätzliches Gen ins Genom integriert, welches als *knock-in*-Modell bezeichnet wird. Diese Methoden werden unter dem Begriff *forward genetics* zusammengefasst. Andererseits gibt es groß angelegte Verfahren, wie die so genannten *large scale*-Mutagenese-Screen-Projekte, bei denen Mutationen (z. B. Punktmutationen) im Genom erzeugt werden, um dabei zufällige Gene zu treffen (*reverse genetics*). Dies geschieht durch die Verwendung eines mutagenisierenden Mittels wie z. B. die Injektion des Ethylnitrosourea (*Ethylnitrosourea*, ENU) (Balling, 2001; Beier and Herron, 2004; Ehling et al., 1985; Hrabe de Angelis and Balling, 1998; Justice et al., 1999), Bestrahlung (Anderson, 1995; Ehling et al., 1985) oder durch *gene trap*-Methoden (Brown and Nolan, 1998; Cecconi and Meyer, 2000; Hansen et al., 2003; Joyner et al., 1992; Wurst et al., 1995).

Die nahezu vollständige Sequenzierung der Genome, als auch die Erstellung von EST- (*expressed sequence tags*) Datenbanken der wichtigsten Modellorganismen in den vergangenen Jahren, stellten unter anderen die Voraussetzung für neue experimentelle Ansätze dar, wie die systematische Identifizierung und funktionelle Charakterisierung nahezu sämtlicher Transkripte (Transkriptomanalyse) und der daraus gebildeten Proteine (Proteomanalyse) eines Zelltyps, Körperorgans oder Organismus. Diese neuen Möglichkeiten tragen zum Verständnis der Regulation von Genen bei, worauf das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt. Bevor genauer darauf eingegangen wird, müssen zunächst grundlegende Begriffe

definiert, biologische Zusammenhänge erklärt und die Motivation solche Analysen durchzuführen, verdeutlicht werden.

Das Genom und die Komplexität des Organismus

Die Erbinformation einer eukaryontischen Zelle enthält eine Vielzahl von Genen, deren Gesamtheit als Genom bezeichnet wird und den Rahmen der Entfaltungsmöglichkeiten eines Organismus absteckt. Lange Zeit hat man vermutet, dass die Erbinformation des Menschen etwa 100.000-120.000 Gene beinhaltet. Diese Zahl musste deutlich nach unten revidiert werden. Innerhalb des humanen Genomprojekts, welches sich mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms beschäftigte, zeigte sich, dass das menschliche Genom circa 20.000–30.000 Genen enthält (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Die Schlussfolgerung, dass scheinbar diese geringe Anzahl an Genen für das Entstehen und Funktionieren eines Menschen ausreichen soll, stellt die Forschung vor eine gewaltige Herausforderung und vor die Frage: Wie erzeugen so wenige Gene eine so hohe Komplexität?

Weiterhin wurde festgestellt, dass die Anzahl der Gene des Menschen in etwa der der Maus entsprechen soll. Außerdem wurde ermittelt, dass beispielsweise von 731 vorhergesagten Genen des Chromosoms 16 der Maus, nur für 14 Gene kein Homolog im humanen Genom gefunden werden konnte, was eine Übereinstimmung von über 98 % auf der Ebene der Gene im untersuchten Umfang darstellt (Mural et al., 2002; Nadeau et al., 2001). Diese in etwa übereinstimmende Genomgröße der Maus und des Menschen und der darin enthaltenen Erbinformation ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass diese die Gestalt einer Maus und die eines Menschen festlegen können. Wie ist es möglich, dass sich Maus und Mensch genotypisch so ähneln, sich phänotypisch aber so stark voneinander unterscheiden? Ein Aspekt könnte darin liegen, dass das Genom der Maus anders reguliert wird, wie das des Menschen. Aber auch das biologische „Umfeld“, in dem sich das Genom „entfaltet“ spielt beispielsweise eine große Rolle. Diese Unterschiede festzustellen und die Regulation des Genoms zu untersuchen stellt ein großes Ziel der Grundlagenforschung dar.

Das Transkriptom

In einem Vorgang, der als Transkription bezeichnet wird, werden von Genen im Zellkern so genannte Boten-RNAs (mRNAs) erstellt. Die Gesamtheit der mRNAs einer Zelle, die zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert werden, wird als Transkriptom bezeichnet. Im Gegensatz zum eher statischen Genom beschreibt das Transkriptom einen dynamischen

Zustand, der den Differenzierungszustand einer Körperzelle reflektiert. Da innerhalb einer Zelle nicht alle vorhandenen Gene gleichzeitig transkribiert werden, umfasst das Transkriptom einerseits so genannte Haushaltsgene (*housekeeping genes*), die praktisch in jeder Körperzelle abgeschrieben werden, wie z. B. Gene, die dem Energiehaushalt der Zelle dienen und andererseits Gene, die zelltypspezifisch sind, wie z. B. ein Immunglobulin-Gen in einer Plasmazelle.

Das Proteom

Die eigentlichen Träger der Funktionen der Gene stellen die Proteine dar. Sie werden in einem Vorgang, der als Translation bezeichnet wird und bei dem der „Vier-Buchstaben-Code“ der Nukleinsäuren in die Aminosäuren der Proteine übersetzt wird, aus den mRNAs gebildet. In Analogie zum Transkriptom wird die Gesamtheit der exprimierten Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt als Proteom bezeichnet. Dieser Begriff wurde auf einer 2D-Elektrophorese-Tagung 1994 in Sienna von dem Australier Marc Wilkins geprägt und ist ein Kunstwort, welches für „*PROTEins expressed by the genOME*“ steht (Wilkins et al., 1996). Die Zusammensetzung des Proteoms ändert sich ständig im Laufe des Zellzyklus oder des Lebens eines Organismus, was bedeutet, dass Proteome ebenso wie Transkriptome dynamisch sind.

Auch wenn die DNA-Sequenz eines Genoms sorgfältig ermittelt und korrekt angeordnet in Datenbanken vorliegt, ist es schwierig, daraus Gene und damit die Informationen aller primären Proteinketten oder gar Proteinfunktionen zu ermitteln. Viele Gene (Pseudogene) kodieren nämlich für keine funktionellen Genprodukte und eine nicht unerhebliche Zahl liegt mitunter weit über das Genom verteilt in mehreren Kopien vor.

Komplexität durch Variabilität

Betrachtet man das Transkriptom und das Proteom einer Zelle, so bestehen große Unterschiede bezüglich der Art der Informationen. Beispielsweise stimmen quantitative Änderungen der mRNA-Transkripte höchstens zu 50 % mit der Proteinbildung überein, was darauf hindeutet, dass Analysen auf mRNA-Ebene nur unvollständig Auskunft über zelluläre Prozesse geben können. Beim Menschen schätzt man, dass bis zu zehn unterscheidbare, jeweils unterschiedlich modifizierte Proteine durch ein und dasselbe Gen kodiert werden können, d. h. mindestens etwa 300.000 verschiedene Proteine durch variable Modifikationen

aus dem Genom hervorgehen können (Lottspeich and Zorbas, 1998). Wie kommt dieser Unterschied zustande und liegt darin die Komplexität des Genoms begründet?

Hinweise darauf findet man bei der Betrachtung der regulatorischen Abläufe innerhalb einer Zelle. So liegt z. B. der Entwicklung eines komplexen Organismus ein regulierter Prozess der Genregulation zugrunde, der auf transkriptioneller, *post*-transkriptioneller und *post*-translationaler Ebene stattfindet. Mit Hilfe des genetischen Programms ist es möglich, die richtigen Gene zur richtigen Zeit und am richtigen Ort während der Embryonalentwicklung zu exprimieren, damit sich ein vollständiger Organismus entwickeln kann. Die Regulation der Genexpression ist ein komplexer Prozess, der seinen Anfang in der regulierten Initiation der Transkription findet. Dieser Initiationsprozess ist unter anderem von der Chromatinstruktur abhängig. So inhibiert eine hohe Dichte des Chromatins (Heterochromatin) den Start der Transkription, während eine lockere Chromatinpackung (Euchromatin) den Start der Transkription begünstigt, indem es den Zugang von Transkriptionsfaktoren an den Startpunkt eines Gens, dem Promotorbereich, im ersten Fall behindert oder, wie im zweiten Fall, ermöglicht. Im Anschluss an die Transkription findet die zweite Modifikationsphase statt. In dieser Phase wird das primäre Transkript einer Vielzahl von *post*-transkriptionellen Modifikationen unterzogen, z. B. das Anhängen der 5'-Kappe oder des PolyA-Schwanzes an das 3'-Ende (Harford und Morris, 1997). Die meisten prä-mRNAs werden nach einem festen Schema gespleißt (konstitutives Spleißen). Darüber hinaus können die Transkripte auch auf verschiedene Weise gespleißt werden (differentielles Spleißen), was die Kodierungsmöglichkeiten eines Gens steigert. Nach dem Spleißen werden die mRNAs vom Kern zu den Ribosomen im Cytoplasma transportiert, um translatiert zu werden und um im Anschluss im Endoplasmatischen Retikulum einer Abfolge *post*-translationaler Modifikationen unterzogen zu werden (z. B. Glykosylierung, Acetylierung, Phosphorylierung).

Aus der obigen Betrachtung wird deutlich, dass eine Darstellung des Zustandes eines Gewebes vor und nach der Proteinbiosynthese Einblicke auf die Regulation von Genen liefern kann. Eine geeignete Methode hierfür ist die Darstellung des Transkriptoms und des Proteoms einer Zelle oder eines Gewebes zu einem definierten Zeitpunkt und deren Vergleich.

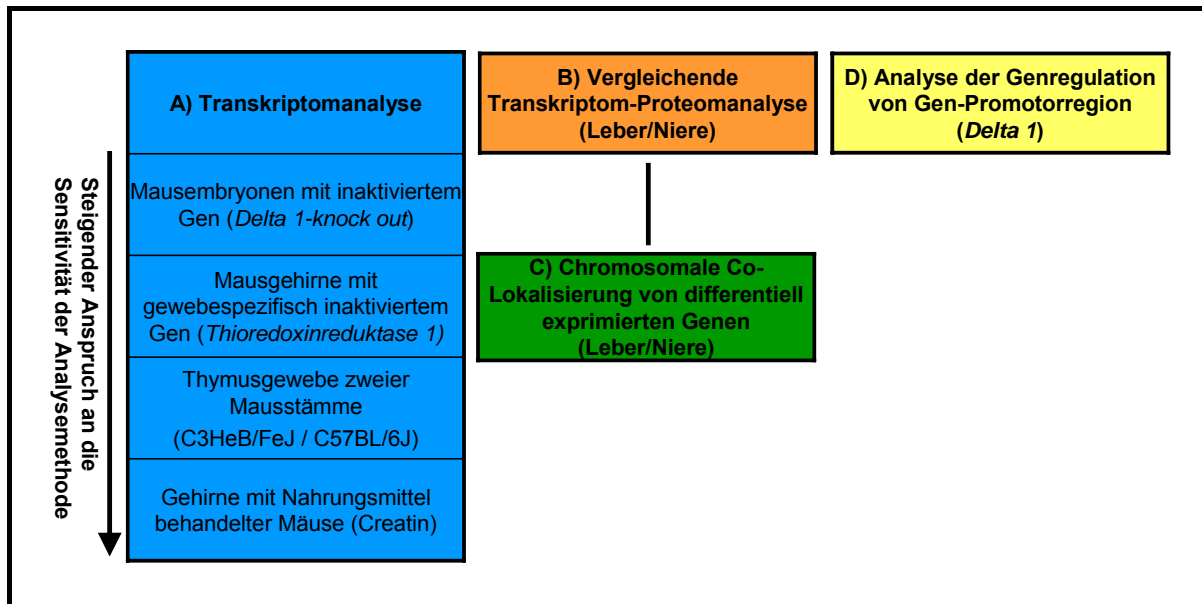


Abbildung 1: Schema der experimentellen Vorgehensweise zur Untersuchung der Genregulation in der vorliegenden Arbeit. A: Transkriptomanalyse in verschiedenen Mausmodellen zur Etablierung der DNA-Chiptechnologie und Überprüfung der Sensibilität der Methode; B: vergleichende Transkriptom- und Proteomanalyse in Leber- und Nierengeweben der Maus; C: Chromosomale Co-Lokalisierung von differentiell exprimierten Genen in Leber- und Nierengewebe der Maus; D: Analyse der Genregulation anhand von Promotorstudien am Beispiel vom *Dll1*-Genexpression in transgenen Mäusen.

A Die Analyse des Transkriptoms

Die Transkriptomanalyse ermöglicht den transkriptionellen Aktivitätszustand des gesamten Genoms einer bestimmten Zellpopulation zu erfassen und darzustellen (Young et al., 2004). Diese kann beispielsweise mittels der DNA-Chiptechnologie erfolgen, mit welcher das Expressionslevel von tausenden von Genen in einem einzigen Experiment dargestellt werden kann (Brown and Botstein, 1999; Lockhart et al., 1996; Pease et al., 1994; Schena et al., 1995). Dabei können Expressionsunterschiede von Genen in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen oder unterschiedlich behandelten Zellen simultan dargestellt und miteinander verglichen werden. Die Erstellung von RNA-Expressionsprofilen wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um die normale Variabilität des Expressionslevels von Leber, Niere und Hoden in der Maus zu analysieren (Pritchard et al., 2001). Diese Methode fand auch erfolgreich bei Studien der Veränderung im Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung oder der Entwicklung der Leber ihre Anwendung (Jochheim et al., 2003). Weiterhin stellt diese Technologie eine vielseitige Methode zur molekularen Phänotypisierung, Identifizierung von neuen Zielgenen oder genetischer Wechselwirkungen dar, wie z. B. der Beteiligung von Genen in Entwicklungs- oder Metaboliten-Signalwegen (Gullans, 2000; Hughes et al., 2000; Machka et al., 2005; Miki et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit spielt die Methode der Erstellung von RNA-Expressionsprofilen zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen zwischen unterschiedlichen Geweben eine zentrale Rolle.

Die DNA-Chiptechnologie

In der DNA-Chiptechnologie werden DNA-Chips eingesetzt, die aus Nylonmembranen oder Glaträgern bestehen, und auf welchen cDNAs oder Oligonukleotide mit bekannten Sequenzen als Probe immobilisiert oder auf dem Träger direkt synthetisiert werden (Bezeichnung: Nature Genetics (Suppl.) 1999, p.1). Um Targets zu erhalten, die mit einem DNA-Chip hybridisiert werden können, wird die Gesamt-RNA, beispielsweise von einem Gewebe, revers transkribiert und radioaktiv oder mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Beim anschließenden Hybridisierungsvorgang binden entsprechend der Probensequenz auf dem DNA-Chip die Targets mit der komplementären Sequenz. Die Menge an markierter cDNA, die an die jeweilige Probe gebunden hat, kann mit Hilfe der Autoradiographie oder durch die Messung der Fluoreszenz-Intensität jedes einzelnen Spots ermittelt werden (Abbildung 2). In Abhängigkeit von der Anzahl der immobilisierten DNA-Proben ist es möglich zu einem definierten Zeitpunkt Genexpressionslevels von wenigen Genen bis hin zu einer genomumfassenden Analyse in einem Experiment zu bestimmen. Bei der Anwendung der Methode der Fluoreszenz-Markierung können zwei verschiedene Targets, wie z. B. genetisch verändertes und wildtypisches Gewebe, auf dem gleichen DNA-Chip direkt in ihrer Intensität verglichen werden (Abbildung 2). Bei der Methode der radioaktiven Markierung müssen unabhängige Hybridisierungen für verschiedene Targets durchgeführt werden. Diese Methode wird trotz dieses Nachteils angewandt, da der Nachweis von Radioaktivität sensitiver ist, als die Bestimmung der Fluoreszenzintensität. Diese Einfarbenhybridisierung setzt außerdem extrem reproduzierbare DNA-Chips voraus. Das hat den Vorteil, dass die Referenz-Targets nur einmal hybridisiert werden müssen und mit den Hybridisierungen verschiedener Test-Targets verglichen werden können.

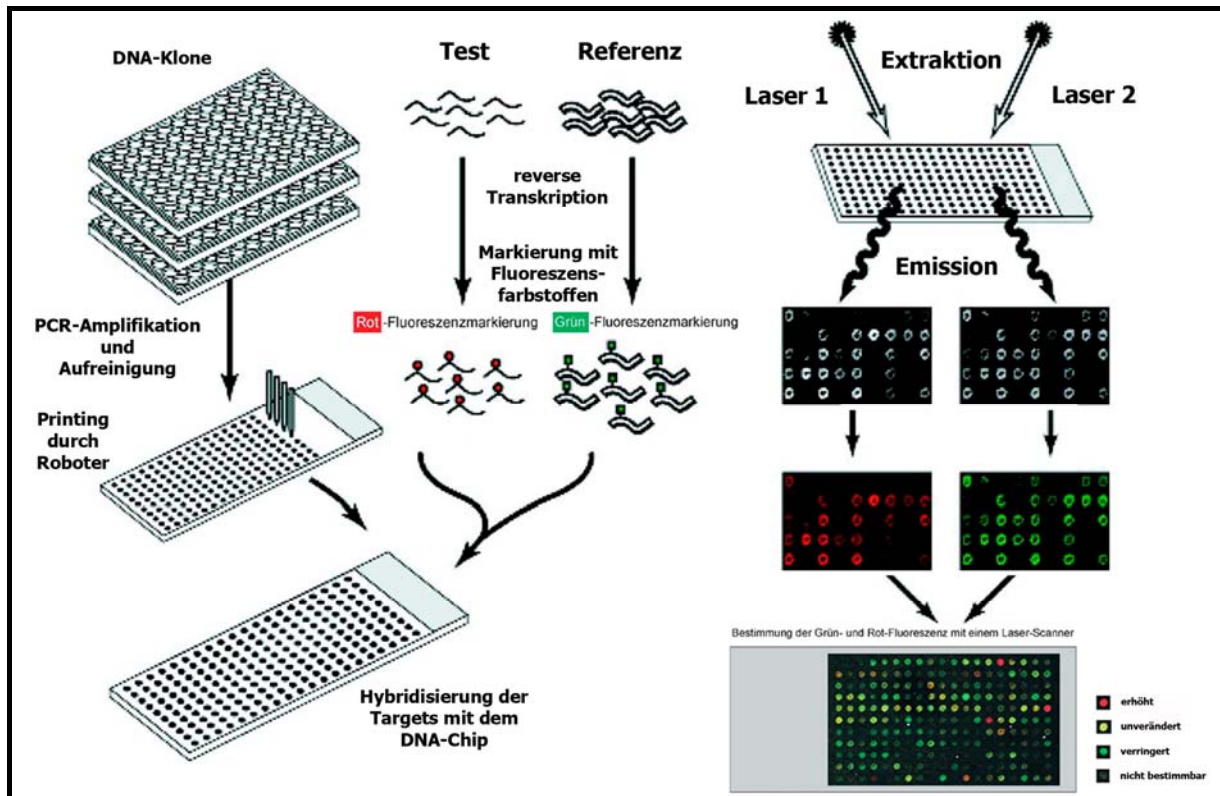


Abbildung 2: DNA-Chiptechnologie. Definierte, sequenzierte cDNA-Klone werden in einer PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend auf eine feste Oberfläche, wie z. B. einem Glaträger als Probe immobilisiert. Aus zu untersuchendem Gewebe isolierte RNA wird revers transkribiert und markiert (z. B. mit einem fluoreszierenden Farbstoff Cy3 oder Cy5). In den folgenden Schritten wird die aufbereitete, markierte Probe mit dem DNA-Chip hybridisiert, ungebundene Targets werden durch Waschstschritte entfernt und der anschließend getrocknete DNA-Chip wird beispielsweise mit einem Fluoreszenz-Scanner analysiert. Anschließend wird der erhaltene Rohdatensatz aus den Intensitätsdaten für jede auf dem DNA-Chip aufbrachte Probe statistisch ausgewertet. (Modifiziert nach Duggan et al., 1999).

Anforderung an die DNA-Chiptechnologie

Die DNA-Chiptechnologie stellt eine leistungsstarke und sensitive Technologie dar, um *large scale*-Experimente durchzuführen. Mit dem Verfahren lassen sich genomumfassende Analysen anfertigen und außerdem ist es bestens dazu geeignet, Untersuchungen mit hohem Durchsatz (*high throughput*-Analysen) durchzuführen. Die Qualität der Ergebnisse hängt dabei stark von folgenden Merkmalen ab: der Qualität der DNA-Chips, der Qualität der verwendeten RNA, der Markierungsreaktion und der Bildbearbeitung der computergestützten statistischen Analyse der erhaltenen Rohdaten (Drobyshev et al., 2003a).

Um auswertbare und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen nachstehende Faktoren der DNA-Chipqualität optimiert werden: die Oberflächenchemie der Glaträger (Polylysin, Aldehydamin, γ -Aminopropylsilan), der Mechanismus der DNA-Immobilisierung (kovalente oder nicht-kovalente Verknüpfung) (Zammatteo et al., 2000), die Art der Probe (cDNA, Oligonukleotide) (Halgren et al., 2001; Kane et al., 2000), die Auswahl der Probensequenz (3'UTR, kodierender Bereich, usw.), die Menge der immobilisierten Probe, die Auswahl des

Verfahrens zum Spotten der DNA und die verwendeten Pins (Schuchhardt et al., 2000). Die hohe Qualität der RNA zur Erstellung von Expressionsprofilen wird durch Verwendung eines geeigneten RNA-Isolierungsprotokolls und anschließender Qualitätskontrolle auf einem denaturierenden Agarosegel erreicht. Die Markierungsreaktion erfolgt durch reverse Transkription der RNA und Markierung der entstandenen cDNA mittels radioaktiver Nukleotide oder fluoreszierender Farbstoffe wie Cy3 und Cy5. Außerdem muss die Markierungseffizienz der Proben, die miteinander verglichen werden sollen, äquivalent sein.

Limitiert ist die DNA-Chiptechnologie hinsichtlich der benötigten Menge an Ausgangsmaterial für Wiederholungsexperimente (technische Replika), die absolut notwendig sind, um signifikante Daten zu erhalten. Eingesetzte Proben können in Abhängigkeit vom Gewebe sehr heterogen sein und unterliegen biologischen Schwankungen, da ein Gewebe aus einer großen Anzahl von verschiedenen Zelltypen besteht. Aus diesem Grund müssen zusätzlich biologische Replika oder Pools aus biologischem Material in der DNA-Chipanalyse verwendet werden.

Der nächste kritische Schritt stellt die Bildauswertung dar, bei der qualitativ „schlechte“ Signale und Signale geringerer Intensität von der Analyse ausgeschlossen werden sollten. Eine weitere Aufgabe liegt in der statistischen Auswertung der Daten, um signifikante Änderungen und biologisch relevante Informationen zu identifizieren.

Anspruch an die Qualität der DNA-Chiptechnologie

In Zusammenhang mit der DNA-Chiptechnologie wird oftmals über die Qualität der RNA-Expressionsdaten diskutiert (Knight, 2001). Diese hängt vor allem von der Genauigkeit der Hybridisierungsreaktionen ab (Drobyshev et al., 2003a). Die Arbeitsgruppe Beckers entwickelte eine experimentelle Methode SAFE (*Specificity Assessment from Fractionation Experiments*), um eine hohe Qualität der RNA-Expressionsdaten gewährleisten zu können. Sie ermöglicht die Unterscheidung zwischen unspezifischen Kreuzhybridisierungen und spezifischen Signalen direkt auf dem DNA-Chip (Drobyshev et al., 2003b). Die SAFE-Methode bietet ein neues experimentelles Werkzeug zur Identifizierung von Proben, die spezifische Hybridisierungssignale in DNA-Chipexpressionsprofilen liefern. Basierend auf den fraktionierten Kurven von hybridisierten cDNA-Targets verschiedener Mausgewebe, liefern demnach 0,2 bis 1,7% der Proben auf unserem selbst hergestellten 20.500 Maus-Glas-DNA-Chip (Lion Bioscience, Mause arrayTAG) unspezifische Signale.

DNA-Chiptechnologie zur Untersuchung unterschiedlicher biologischer Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit galt es zu untersuchen, ob mit Hilfe der RNA-Expressionsanalyse im Mausmodell sowohl eine ausreichend umfangreiche als auch prinzipiell erfolgreiche Studie der Genexpression anhand von unterschiedlichen biologischen Fragestellungen möglich ist. Hierfür eignet sich das Modellsystem Maus vor allen Dingen, da die Maus eine für Säugetiere kurze Generationszeit hat, eine große Anzahl von Mausinzuchtstämmen existieren, die für Genexpressionsexperimente (Verringerung der Heterogenität) erforderlich sind und die Maus evolutionsgenetisch dem Menschen sehr ähnlich ist. Außerdem nimmt der Umfang der Informationen über das Genom, Transkriptom und Proteom der Maus sowie die zur Verfügung stehende Anzahl von mutierten und gezielt markierten Allelen immer mehr zu. Die Auswahl der Beispiele wurde so gewählt, dass Anwendungsmöglichkeiten, aber auch Grenzen der Sensitivität dieser Analysemethode aufgezeigt werden.

In einer *knock-out*-Maus wird eine massivere Transkriptomveränderung im Vergleich zu wildtypischen Tieren erwartet, als bei einer durch Nahrungssupplementation beeinflussten Maus verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren. Damit ist der Anspruch an die Nachweismethode zur Untersuchung der regulierten Transkripte unterschiedlich hoch.

Mittels der DNA-Chiptechnologie wurden innerhalb dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

Ist es möglich mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie signifikante Unterschiede in der Genexpression

1. in Mausembryonen mit einem inaktivierten Gen, anhand der *Dll1-knock-out*-Maus
2. in Mausgehirnen mit gewebespezifisch inaktiviertem Gen, anhand der *Thioredoxinreduktase 1-knock-out*-Maus
3. in Gewebe zweier verschiedener Mausstämmen, anhand des Vergleichs des Thymus von Mäusestämmen C3HeB/FeJ und C57BL/6J
4. in einem Gehirn von Mäusen, die mit dem Nahrungsergänzungsmittel Creatin supplementiert wurden

zu identifizieren.

A.1 RNA-Expressionsanalyse von Mausembryonen mit inaktiviertem Gen: Die *Dll1*-knock-out-Maus

A.1.1 Der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg

Der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg wurde in den vergangenen Jahrzehnten intensiv in verschiedenen multizellulären Organismen untersucht, weil er in einem großen Spektrum von Zellschicksalen und Entwicklungsprozessen involviert ist. Dennoch sind bislang nicht alle Facetten dieser Signaltransduktionskaskade geklärt.

Der Delta-Notch-Signaltransduktionsweg ist ein evolutionär konservierter Mechanismus, der in Metazoen (z. B. der Fliege, dem Seeigel, dem Menschen, usw.) Zellschicksale durch lokale Zellinteraktionen kontrolliert. Er wurde das erste Mal in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Cabrera, 1990; Campos-Ortega and Knust, 1990; Corbin et al., 1991) entdeckt. Seither konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg darüber hinaus noch im Frosch *Xenopus laevis* (Coffman et al., 1990), in der Maus *Mus musculus* (Lardelli and Lendahl, 1993; Weinmaster et al., 1992), im Menschen (Larsson et al., 1994), beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Henderson et al., 1994; Kimble and Simpson, 1997; Petcherski and Kimble, 2000), im Zebrafisch *Danio rerio* (Jiang et al., 1996), im Huhn (Myat et al., 1996) sowie in der Spinne *Cupiennius salei* (Stollewerk et al., 2003) vielfältige Funktionen hat.

Der Delta-Notch-Signalweg ist z. B. in der Maus während der Embryonalentwicklung in verschiedenen Musterbildungsprozessen involviert, wie z. B. in der lateralen Spezifizierung während der Neurogenese (Lewis, 1998; Lutolf et al., 2002), bei der Rechts-Links Organisation (Krebs et al., 2003; Przemeck et al., 2003), bei der Synchronisierung und Organisation der Segmentierungsuhr während der Somitenbildung (Bessho et al., 2003; Bessho and Kageyama, 2003; Dale and Pourquie, 2000; Hrabe de Angelis et al., 1997; Oka et al., 1995), bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Somitengrenzen während der Somitogenese (Hrabe de Angelis et al., 1997) und bei der Pankreasentwicklung (Apelqvist et al., 1999; Lammert et al., 2000).

Es handelt sich um einen Zellinteraktionsmechanismus, bei dem Signale in Form einer Ligand-Rezeptor-Signalübermittlung zwischen benachbarten Zellen ausgetauscht werden. Dieser Prozess läuft vereinfacht wie folgt ab: die Liganden (siehe A.1.1.1) einer Zelle binden an die Rezeptoren (siehe A.1.1.2) einer benachbarten Zelle, die auf diese Weise aktiviert werden und das Signal an die so genannten Effektoren (siehe A.1.1.3) übermitteln. Die Effektoren wiederum leiten das Signal in den Kern der Rezeptorzelle weiter, um anschließend die Expression von Zielgenen (siehe A.1.1.4) in der Rezeptorzelle zu aktivieren.

A.1.2 Komponenten des Delta-Notch-Signaltransduktionsweges

A.1.1.1 Die Liganden

Die Liganden des Delta-Notch-Signaltransduktionsweges werden zur Gruppe der DSL-Transmembranproteine (Delta, Serrate, Lag-2) zusammengefasst. Dieser Gruppe wurden ursprünglich Delta und Serrate aus *Drosophila* (Fleming et al., 1990; Kopczynski et al., 1988; Thomas et al., 1991) sowie LAG-2 aus dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Lambie and Kimble, 1991b) zugeordnet. Es handelt sich bei diesen Proteinen um Transmembranproteine, welche in ihrer extrazellulären Domäne (N-terminaler Bereich) zahlreiche EGF- (*epidermal growth factor*) Motivwiederholungen besitzen. Diese Motivwiederholungen variieren stark zwischen den einzelnen DSL-Proteinen. Obwohl die meisten DSL-Proteine relativ wenige Sequenzhomologien aufweisen, besitzen sie alle ein gruppenspezifisches modifiziertes EGF-Motiv im N-terminalen Bereich, welches als DSL-Domäne bezeichnet wird.

Weitere evolutionär konservierte Homologe der DSL-Proteine von Delta und Serrate wurden in den vergangenen Jahren in vielen Spezies identifiziert (Appel and Eisen, 1998; Bettenhausen et al., 1995; Chitnis et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Henrique et al., 1995; Jen et al., 1997; Lindsell et al., 1995; Shawber et al., 1996). In der Maus konnten bislang drei Delta-Proteine, Delta 1 (Dll1), Delta 3 (Dll3) und Delta 4 (Dll4) und zwei Serrate-Homologe, Jagged 1 (Jag1) und Jagged 2 (Jag2) aufgefunden werden (Bettenhausen et al., 1995; Dunwoodie et al., 1997; Oda et al., 1997; Shawber et al., 1996; Shutter et al., 2000).

Mutationen in den Liganden-Genen der Maus führen zu skelettalen Störungen (Delta 3) und zur embryonalen Letalität (Delta 1, Jagged 2). Beim Menschen sind Mutationen der Liganden DLL3 und JAG1 mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. So ist z. B. die spondylokostale Dysostose eine Erkrankung, die auf eine Missense-Mutation des DLL3-Proteins zurückzuführen ist (Bulman et al., 2000). Mutationen des *Jag1*-Gens sind der Grund für das Alagille-Syndrom (Krantz, 2002; Krantz et al., 1997).

A.1.1.2 Die Rezeptoren

Die Rezeptoren des Notch-Signaltransduktionswegs sind die „EGF-like“ Motivwiederholung tragenden LNG-Transmembranproteine. Die ersten isolierten Mitglieder dieser Proteingruppe waren LIN-12 von *C. elegans*, Notch von *Drosophila* und GLP-1 von *C. elegans* (Greenwald, 1985; Wharton et al., 1985). Vertebraten Notch-Homologe wurden in der Maus, in *Xenopus*, im Hühnchen und im Menschen gefunden (Lardelli et al., 1994; Larsson et al., 1994; Uyttendaele et al., 1996; Weinmaster et al., 1991).

Auf der intrazellulären Seite besteht das Notch-Protein aus einer RAM-Domäne, sechs Ankyrin-Wiederholungen, einer TAD-Domäne (Transkriptionsaktivierungsdomäne) und aus einer Pest-Domäne (Prolin-, Glutamin-, Serin-, Threonin-reiche Region). In diesem Bereich befinden sich auch zwei nukleare Lokalisierungssequenzen (Baron et al., 2002). Die extrazellulären N-terminalen EGF-Motivwiederholungen sind für die Interaktion mit der DSL-Domäne der Liganden notwendig (Rebay et al., 1991). Außerdem ist für die aktive Signaltransduktion die Endozytose des Rezeptor-Ligand-Komplexes in die Signalempfangende Zelle von Bedeutung (Henderson et al., 1997). Die Signaltransduktion erfolgt durch die proteolytische Spaltung des zytoplasmatischen Teils des Notch-Rezeptors in einem 3-Schritt-Mechanismus. Während des sekretorischen Transports durch den Golgi-Apparat wird Notch durch eine Furin-Protease gespalten und als Heterodimer auf der Zelloberfläche präsentiert (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Die ADAM-Metalloprotease Kuzbanian (Kuz) oder TACE (*TNF- α -converting enzyme*) und die Preseniline sind an der weiteren Reifung des Notch Proteins beteiligt (Brou et al., 2000; De Strooper et al., 1999; Struhl and Greenwald, 1999). Die entstandene Notch intrazelluläre Domäne (NICD) wird anschließend in den Kern transportiert, um mit den Effektorproteinen zu interagieren (siehe A.1.1.3).

In Vertebraten wurden vier Notch Gene identifiziert (Notch 1-4) (Coffman et al., 1990; Del Amo et al., 1992; Weinmaster et al., 1992). Neben den morphologischen Veränderungen in Notch defizienten Mäusen wurden auch Erkrankungen aufgrund von Mutationen innerhalb der NOTCH 1 und NOTCH 3 des Menschen festgestellt. Beispielsweise führen Defekte innerhalb des NOTCH 1 Gens zu einer akuten lymphoblastischen T-Zellen Leukämie (Bresnick et al., 2000) und Mutationen des NOTCH 3 Gens zu CADASIL (zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie).

A.1.1.3 Die Effektoren

Bei den Effektoren der Notch-Signaltransduktion handelt es sich um Transkriptionsfaktoren der CSL-Proteinfamilie (CBF1/Suppressor of Hairless (Su(H))/Lag-1) und um transkriptionelle Co-Aktivatoren der mit *mastermind* verwandten Proteinfamilie (MAML, MAML 1-3 in Vertebraten). Die CSL-Proteinfamilie beinhaltet die Transkriptionsfaktoren CBF1 (auch bekannt als RBP-Jk und KBF2) in Vertebraten (Henkel et al., 1994; Matsunami et al., 1989), Su(H) in *Drosophila* (Ashburner, 1982) und Lag-1 in *C. elegans* (Lambie and Kimble, 1991a). Alle CSL-Proteine zeichnen sich durch eine konservierte und 400 Aminosäuren große DNA-Bindungsdomäne aus und können sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren agieren (Bailey and Posakony, 1995; Henkel et al., 1994; Hsieh and Hayward, 1995).

Die Effektor-Gene kommen dann zum Einsatz, wenn die intrazelluläre Domäne von Notch (NICD) den Zellkern erreicht hat. Die Effektor-Gene bilden dann einen ternären Komplex, bestehend aus NICD-MAML-CSL. Dieser ternäre Komplex bindet über die CSL-Bindedomäne an die DNA und aktiviert bzw. reprimiert die Transkription der Zielgene.

A.1.1.4 Die Zielgene

Genetische und molekulare Studien in *Drosophila* haben gezeigt, dass die Enhancer of Split E(spl)-Proteinfamilienmitglieder die ersten Zielgene sind, die nach der Aktivierung von Notch und der Bildung des ternären Komplexes gebildet werden (Bailey and Posakony, 1995; Lecourtois and Schweisguth, 1995). Die E(spl)-Gene kodieren für basic-helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren, die innerhalb der Metazoenpezies viele Homologe besitzen, so z. B. die Maus E(spl)-Homologe Hes 1-5 (Sasai et al., 1992; Takebayashi et al., 1995). Die transkriptionelle Aktivierung der E(spl)/Hes-Gene führt zur Translation der korrespondierenden Genprodukte, welche wiederum die Expression des *achaete-scute*-Genkomplexes (*ac-sc*; *Mash*-Gene in Vertebraten) reprimieren. Der *ac-sc*-Genkomplex beinhaltet proneurale Gene, die für Proteine kodieren, die wiederum in die Segmentierung von neuronalen und epidermalen Zelllinien involviert sind. Es hat sich außerdem gezeigt, dass die *ac-sc*-Gene für die Expression des Liganden Delta essentiell sind.

Um neue Zielgene von *Dll1* zu identifizieren wurde in der vorliegenden Arbeit eine RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-Embryonen des Genotyps *Dll1*^{LacZ/LacZ} versus *Dll1*^{+/+} durchgeführt.

A.2 RNA-Expressionsanalyse von Mausgehirnen mit einem gewebespezifisch inaktivierten Gen: die Thioredoxinreduktase 1-knock-out-Maus

A.2.1 Das Thioredoxin-Redox-System

Das Thioredoxin-Redox-System ist eines der bedeutendsten Redox-Systeme in tierischen Zellen, welches aktiv die intrazelluläre Redox-Umgebung reguliert (Holmgren, 1985). Das System ist in einer Vielzahl von biochemischen Prozessen, wie Zellteilung und Zelltod, involviert. Das Thioredoxin-Redox-System besteht aus Thioredoxin (Txn) und Thioredoxinreduktase (Txnrd).

A.2.2 Die Familie von Thioredoxin und Thioredoxinreduktase

Bislang sind drei Typen von Thioredoxinreduktasen bekannt, das cytosolische Enzym Txnrd1, das mitochondriale Enzym Txnrd2 und das in den Hoden exprimierte Txnrd3 (Hazel et al., 1988; Kawai et al., 2000). Txnrd1 und Txnrd2 zeigen eine ubiquitäre Expression. Die Thioredoxinreduktasen sind Mitglieder der Selenoprotein-Familie, da alle drei Selenocystein als vorletzte Aminosäure beinhalten, die zugleich Bestandteil des dort befindlichen C-terminalen, redoxaktiven katalytischen Zentrums ist. Das eigentliche Substrat der Thioredoxinreduktasen (Txnrd) sind die Thioredoxine. Bei den Säugetieren wurden bisher *Thioredoxin 1* und *Thioredoxin 2* kloniert (Sun et al., 1999; Tagaya et al., 1989).

Es wurde in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass humanes Txnrd1 für die Auslösung von Apoptose in diversen humanen Tumorzelllinien verantwortlich ist (Hu et al., 2001). Die Beteiligung von Txnrd1 an apoptotischen Prozessen konnte dadurch erklärt werden, dass Txnrd1 die Aktivitäten von Caspase 8 und p53 moduliert und damit den Zelltod auslöst. Mutationsstudien von Txnrd1 führten zu dem Ergebnis, dass das Fehlen der so genannten *interface domain* von Txnrd1 eine langsamere Proliferation bei gleichzeitigem Anstieg der Apoptoserate von Tumorzellen induziert (Ma et al., 2002).

Außerdem ergab die Analyse von diversen Tumorgeweben eine erhöhte *Txnrd1*-Expression bzw. *Txnrd1*-Aktivität. Zum Beispiel konnte im neoplastischen Lebergewebe der Ratte eine erhöhte Thioredoxinreduktase-Aktivität festgestellt werden (Bjorkhem et al., 2001). *In vivo*-Studien an Mäusen mit transplantierten Tumorzellen zeigten, dass *Txnrd1* das Tumorstadium hemmt (Lindner et al., 2002), und dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen *Txnrd1* und dem Tumorsuppressorgen *p53* besteht (Moos et al., 2003).

A.2.3 Analyse der Genfunktion von Txnrd1

Um die Genfunktion von *Txnrd1* im Detail zu studieren, wurden *Txnrd1-knock-out*-Mäuse generiert. *Txnrd1-knock-out*-Mäuse sind embryonal letal, was die bedeutende Rolle des Thioredoxin-Redox-Systems in der Säugetierentwicklung beweist. Um postnatale Untersuchungen durchführen zu können, wurde ein gewebespezifischer, auf neuronale Vorläuferzellen (Nestin positive Zellen) beschränkter, konditionaler *Txnrd1-knock-out* in der Maus generiert (Jakupoglu et al., 2005). Die phänotypische Analyse zeigte, dass die Tiere bereits in einem Alter von 10 Tagen *post partum* (*p. p.*) Einschränkungen in der Bewegung aufwiesen. Die Tiere waren deutlich kleiner und leichter als ihre wildtypischen Altersgenossen und ihr Verhalten war durch Zittern und *Ataxie* gekennzeichnet. Die Untersuchung des Gehirns zeigte kleine Veränderungen in der Größe des Cerebellums bei

Tag 7 *p. p.* Da sich das Cerebellum der Mäuse bis zum Lebensalter von 3 Wochen am stärksten entwickelt, wurden die Tiere im Alter von 20 Tagen erneut auf Abnormalitäten untersucht. Das Gehirn der untersuchten Tiere wies zu diesem Zeitpunkt eine massive cerebellare Hypoplasie auf (Jakupoglu et al., 2005). Es zeigte sich, dass *Txnrd1*-Defizienz in neuronalen Vorläuferzellen zu Zellproliferationsstörungen in Cerebellum führt. Diese Tiere sind nicht lebensfähig und sterben innerhalb von 25-35 Tagen nach der Geburt (Jakupoglu et al., 2005).

Um Unterschiede in der Genexpression zwischen *Txnrd1*-defizienten und wildtypischen Mäusen aufzuzeigen und neue Zielgene von *Txnrd1* zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine RNA-Expressionsprofilanalyse erstellt.

A.3 RNA-Expressionsanalyse am Gewebe zweier Mausstämme, anhand des Vergleichs des Thymus der Mausstämme C3HeB/FeJ und C57BL/6J

A.3.1 Die German Mouse Clinic

Die *German Mouse Clinic* (GMC; www.mouseclinic.de) ist ein Phänotypisierungszentrum, welches innerhalb des *National Genome Research Networks* (NGFN) und in Zusammenarbeit mit dem *pan-European consortium* (EUMORPHIA) gegründet wurde. Diese Einrichtung, die sich an der GSF in München befindet und mit einer Vielzahl von Forschungseinrichtungen weltweit zusammenarbeitet, ermöglicht eine standardisierte und im großen Umfang stattfindende phänotypische Analyse von Mausmutanten und stellt auf diese Weise eine effiziente, vergleichende Analyse der stetig zunehmenden Zahl an Mausmutanten sicher (Gailus-Durner et al., 2005). Die Bildung von mutierten Mauslinien durch *knock-out*-, transgene- oder Mutagenesetechnologien erzeugt eine große Sammlung von Mausmodellen für die *in vivo*-Analyse verschiedener Genfunktionen. Viele dieser Mausmodelle stellen potentielle Modelle für das Studium humaner Krankheiten dar. Um die große Anzahl von verschiedenen Mausmodellen vollständig und effizient analysieren zu können, muss sowohl die Qualität als auch das Ausmaß der phänotypischen Analysen genauestens organisiert und koordiniert werden. Spezialisten unterschiedlicher Fachgebiete aus zahlreichen Instituten arbeiten im GMC zusammen und ermöglichen auf diese Weise eine interdisziplinäre Kommunikation und enge Verknüpfung von verschiedenen wissenschaftlichen Gebieten. Die phänotypische Analyse der verschiedenen Mausmutanten umfasst die Gebiete Allergologie, Verhalten, Knochen- und Knorpelentwicklung, klinische Chemie, Augenentwicklung, Energiemetabolismus, Immunologie, Lungenfunktion, Neurologie, Schmerzempfindlichkeit,

molekulare Phänotypisierung, Steroidmetabolismus und Pathologie (Abbildung 3). Die mutanten Mauslinien der *German Mouse Clinic* durchlaufen zuerst einen vergleichenden und standardisierten Primärscreen, bei dem ca. 240 verschiedene Parameter je Maus bestimmt werden. Dafür ist es wichtig einen Arbeitsablauf zu generieren, der es erlaubt, eine Vielzahl von nicht-invasiven Tests an Tieren einer Gruppe durchzuführen, ohne dass große Interferenzen zwischen den einzelnen Untersuchungen auftreten. 26 verschiedene mutierte Mauslinien können pro Jahr im Primärscreen analysiert werden. In Abhängigkeit von den Ergebnissen des Primärscreens schließen sich der Sekundär- und Tertiärscreen an, in dem weitere spezielle Untersuchungsmethoden zum Einsatz kommen.

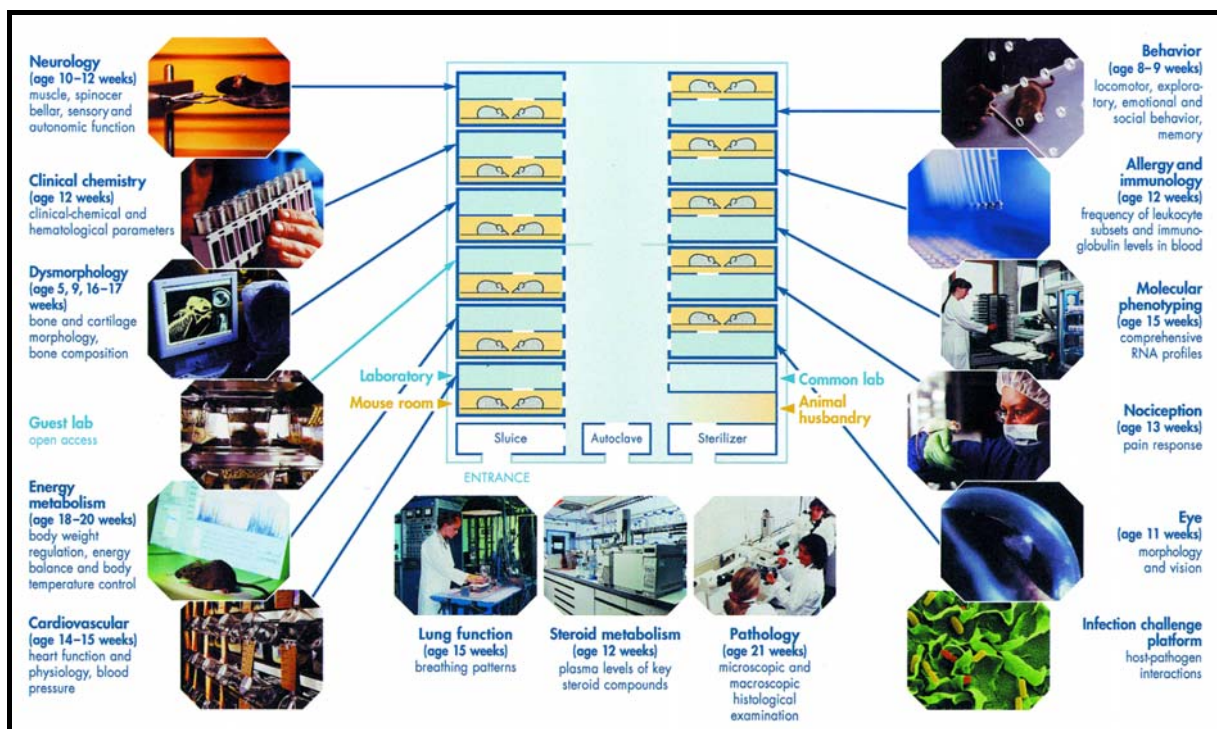


Abbildung 3: Die German Mouse Clinic (GMC) an der GSF in München. Grafische Darstellung des Phänotypisierungsscreens, der die Gebiete der Allergologie, Verhalten, Knochen- und Knorpelentwicklung, klinische Chemie, Augenentwicklung, Energiemetabolismus, Immunologie, Lungenfunktion, Neurologie, Schmerzempfindlichkeit, molekulare Phänotypisierung, Steroid-Metabolismus und Pathologie umfasst. Nach dem Einbringen der Tiere in den Screen durchlaufen die Mäuse die einzelnen Screen-Stationen. Zusätzliche Screens für wirt-pathogene Wechselwirkungen, kardiovaskuläre Erkrankungen und somatosensorische Phänotypisierung werden an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) bzw. am Max Delbrück Centrum (MDC) durchgeführt (Gailus-Durner et al., 2005).

In Zusammenarbeit mit der GMC wurde die RNA-Expressionsanalyse als Teil einer Vielzahl von Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung von zwei Mausstämmen, C3HeB/FeJ und C57BL/6J, angewandt, die als „genetischer Hintergrund“ für die Generierung von Mausmutanten eingesetzt werden. Die Ergebnisse sollen weitere umfassende standardisierte Phänotypisierungen von Mausmutantenlinien im Rahmen des GMC ermöglichen und erleichtern.

A.4 RNA-Expressionsanalyse von Gehirnen von Mäusen, die mit dem Nahrungsergänzungsmittel Creatin supplementiert wurden

A.4.1 Das Creatin/Creatin-Phosphat-System und dessen Funktion in der Zelle

Creatin (Cr) ist ein natürlicher Bestandteil des Energiestoffwechsels. Durch das Enzym Creatin-Kinase kann ein energiereicher Phosphatrest (P) des ATP auf Creatin übertragen werden, wodurch Creatinphosphat und ADP entstehen. Creatinphosphat dient als Energiespeicherform und kann Orte der zellulären Energieproduktion mit denen des Energieverbrauchs verbinden. Frühere Studien zeigten, dass Creatin einen neuroprotektiven Effekt in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Modellsystemen neurodegenerativer Erkrankungen hat. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass eine Therapie mit Creatin einen neuroprotektiven Schutz nach Ausbruch der klinischen Symptome in Huntington-kranken transgenen Mäusen vermittelt (Dedeoglu et al., 2003). In transgenen Nagetiermodellen der Huntington-Krankheit führte die Gabe von Creatin zu einer Verbesserung der motorischen und kognitiven Leistung und verlängerte das Überleben (Andreassen et al., 2001; Ferrante et al., 2000; Shear et al., 2000). Auf welche Weise Creatin diese Wirkung erzielt bzw. vermittelt, ist bislang nur unvollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass die Beeinträchtigung der Mitochondrien bei der Huntingtonschen Chorea eine Schlüsselrolle in der Pathogenese spielt. Man nimmt daher an, dass die Anreicherung des intrazellulären Energielevels, ein Prozess an dem Creatin nachweislich beteiligt ist, den neurodegenerativen Prozess verbessern kann (Bender et al., 2005). Momentaner Stand der Forschungen ist demnach, dass die Wirkung von Creatin auf seine Funktion als Energielieferant zurückzuführen ist.

Seit einigen Jahren wird der Einsatz von Creatin auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen im Tiermodell erprobt. Zum Teil dramatische neuroprotektive Effekte von Creatin konnten beispielsweise in Tiermodellen zu Parkinson und Amyotropher Lateralsklerose (ALS) gezeigt werden. Die entsprechend behandelten Tiere lebten zum Teil länger, wiesen eine bessere motorische Leistung und geringere histologische Veränderungen auf. Gerade bei Parkinson konnte ein großer Teil der Neuronen geschützt werden (Andres et al., 2005; Ellis and Rosenfeld, 2004; Ferrante et al., 2000).

Derzeit gibt es verstärkt Bemühungen, diese experimentellen Daten auf den Menschen zu übertragen. Festgehalten werden muss, dass es bisher keine Studie am Menschen gibt, die bei einer medizinischen Indikation im Sinne der Neuroprotektion einen Creatin-Effekt gezeigt hätte. Nachgewiesen werden konnte, dass die orale Supplementierung von Creatinmonohydrat die Gesamtmenge an Creatin im menschlichen Gehirn erhöht (Dechent et al., 1999). Erst vor

kurzem wurde bekannt, dass eine Creatin-Supplementierung den Level des Neurotransmitters Glutamat im Gehirn von an Chorea Huntington erkrankten Menschen verringern kann (Bender et al., 2005). Glutamat-vermittelte Excitotoxizität (induzierte Apoptose) spielt vermutlich eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Huntington und deutet auf ein therapeutisches Potential von Creatin hin. Weitere klinische Langzeit-Studien sind notwendig, um diese Daten zu bestätigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine RNA-Expressionsanalyse an Gehirnen von Mäusen durchgeführt, die mit Creatin als Nahrungsergänzungsmittel supplementiert wurden mit dem Ziel, Unterschiede in der Genexpression zwischen mit Creatin-behandelten und unbehandelten Mäusen festzustellen.

B Vergleichende Analyse des Transkriptoms und Proteoms

Die meisten biochemischen Prozesse innerhalb und zwischen Zellen sind auf eine Wechselwirkung zwischen Proteinen oder zwischen Proteinen und deren Substrate zurückzuführen. Das Proteom einer Zelle ist das Resultat von kontrollierter Biosynthese und wird daher größtenteils (aber nicht ausschließlich) durch die Genexpression reguliert. Hingegen kann das Transkriptom als eine Abschrift (*read-out*) des Proteoms oder des biochemischen Zustands der Zelle betrachtet werden. Das bedeutet, dass Transkriptom und Proteom auf hoch komplexe und kontrollierte Weise miteinander in Wechselwirkung stehen. Bislang ist wenig über die Korrelation von Transkriptom und Proteom bekannt und das Wissen darüber beschränkt sich auf einige Signaltransduktionswege und metabolische Kaskaden. Um die gegenseitige regulatorische Wechselwirkung zwischen Transkriptom und Proteom zu verstehen ist ein vergleichendes Verfahren notwendig, welches die simultane Aufzeichnung der Expression auf RNA- und Proteinebene erfordert.

Grundlegende Technologien für genomumfassende Expressionsanalysen sind sowohl auf dem mRNA- (Lockhart et al., 1996; Pease et al., 1994; Schena et al., 1995; Schena et al., 1996) als auch auf dem Proteinlevel (Gauss et al., 1999; Klose et al., 2002; Tsugita et al., 2000) verfügbar. Der gegenwärtige Stand der Wissenschaft zeigt, dass wenige Daten über vergleichende Transkriptom- und Proteomanalysen in einem komplexen Organismus zur Verfügung stehen. Es liegen nur einige wissenschaftliche Ergebnisse von Forschergruppen vor, die Untersuchungen mit menschlichen Blutplättchen (McRedmond et al., 2004), Herzgewebe (Ruse et al., 2004) und *Anopheles* und *Culex Speicheldrüsen* (Ribeiro et al., 2004; Valenzuela et al., 2003) durchgeführt haben. In Nagetieren korrelierte die

Proteomanalyse von ursprünglichen *Islet*-Zellen des Pankreas mit den RNA-Expressiondaten von aufgereinigten ursprünglichen beta-Zellen aus der Ratte (Cardozo et al., 2003).

Innerhalb dieser Arbeit wurden auf DNA-Chips basierende RNA-Expressionsprofile, 2D-Gelelektrophoresen und anschließende Massenspektroskopien angewandt, um die generelle Durchführbarkeit einer vergleichenden Genexpressionsanalyse zu erforschen. Zu diesem Zweck wurde als repräsentatives Beispiel eine vergleichende RNA- und Protein-Expressionsprofilanalyse von Leber- und Nierengewebe adulter männlicher Mäuse durchgeführt. Der Vergleich dieser zwei verschiedenen Gewebetypen lässt eine große Anzahl von differentiell exprimierten Genen erwarten, die es erst ermöglichen die folgenden zwei Hauptfragen zu beantworten: (1) korreliert die Proteinexpression mit der transkriptionellen Regulation für die meisten der differentiellen Proteine und (2) detektieren Methoden zur Transkriptomanalyse und Methoden zur Proteomanalyse funktionelle Kategorien mit verschiedenen Präferenzen?

B.1 Die Analyse des Proteoms

Unter der Proteomanalyse versteht man u. a. die globale Analyse von Interaktionen, *post*-translationalen Modifikationen und molekularen Netzwerken. Dazu können Techniken wie, z. B. das Two-Hybrid-System (Uetz and Hughes, 2000), die Tandemaffinitätsaufreinigung (Tandem affinity purification; TAP) (Gavin et al., 2002), die Immunopräzipitation in großem Maßstab (Ho et al., 2002) und die 2D-Gelelektrophorese (Gorg, 1993; Gorg et al., 2000; Klose and Spielmann, 1975; O'Farrell, 1975) eingesetzt werden. Ziel der Proteomanalyse ist es, möglichst viele Proteine einer Zelle bzw. eines Gewebes zu identifizieren und ihre quantitativen Veränderungen sowie Modifikationen zu erfassen. Die Proteomanalyse besitzt das Potential, die Eigenschaften eines biologischen Systems, welche nicht aus der Kenntnis der DNA- oder der mRNA-Sequenz alleine ersichtlich sind, wie beispielsweise die Quantität der Proteinexpression, die subzelluläre Lokalisierung, den Zustand von Modifikationen, die Assoziierung mit Liganden und die Rate der zeitlichen Veränderung dieser Eigenschaften zu bestimmen (Gygi et al., 1999).

B.1.1 Proteomanalyse mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie

Technisch betrachtet kann der Ablauf einer Proteomanalyse in drei Schritte unterteilt werden: (1) Proteinisolierung, (2) Trennung der einzelnen Proteine und (3) ihre Identifizierung. Für die meisten Analysen wird die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese)

verwendet, welche die Proteine nach ihrer Ladung und Masse auftrennt. Das erste Mal wurden Proteine in zwei Dimensionen im Jahr 1956 von Smithies und Poulik getrennt (Smithies and Poulik, 1956). Die moderne Form der Methoden zur Auftrennung und Visualisierung von Proteingemischen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese entstand 1975 in Arbeiten von Joachim Klose und Patrick O'Farrell und ist derzeit eine der empfindlichsten Methoden zur Auftrennung komplexer Proteingemische (Gorg, 1993; Gorg et al., 2000; Klose and Spielmann, 1975; O'Farrell, 1975). Erste Versuche Proteome ganzer (Mikro-) Organismen zu untersuchen wurden schon Anfang der 80-er Jahre unternommen (Anderson et al., 1978). Die 2D-Gelelektrophorese stellt den Proteinstatus eines Organs, Gewebes oder einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt dar. Die Kombination der deskriptiven 2D-Gelelektrophorese mit der analytischen Technik der Massenspektroskopie (Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time-of-Flight-(MALDI-TOF)-Massenspektroskopie; Electrospray-Ionisation-(ESI)- Massenspektroskopie) hat die Möglichkeit eröffnet, die Identität der aufgetrennten Proteine festzustellen. Die Massenspektroskopie erlaubt es Proteine von Organismen, deren Genome sequenziert sind, mittels Analyse von Peptidmassen (*peptide mass fingerprinting*). Darüber hinaus bietet die Massenspektroskopie die Möglichkeit zur Primärstrukturcharakterisierung und die Identifizierung *post*-translati onaler Modifikationen.

B.1.2 Funktionsweise der 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie

Die Trennung der Proteine mittels der 2D-Gelelektrophorese erfolgt in zwei Schritten: zunächst werden die Proteine der Probe voneinander getrennt. Dabei erfolgt die Separation in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung aufgrund der Ladung der Proteine. Als zweite Dimension schließt sich senkrecht dazu eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese an, die die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auftrennt. Auf qualitativ sehr guten 2D-Gelen können auf diese Weise mehr als 10.000 Proteine voneinander getrennt werden. Nach der Trennung im 2D-Gel erfolgt im zweiten Schritt die Identifizierung der Protein-Spots. Hierfür werden die Spots aus dem Gel herausgeschnitten und die Proteine durch Verdau mit spezifischen Proteasen in Fragmente zerlegt. Die Massen der Fragmente, die bei einem solchen Verdau erhalten werden, sind für jedes Protein so charakteristisch wie ein Fingerabdruck. Ein Vergleich der erhaltenen Massen mit den entsprechenden Daten, die aus bekannten DNA- oder Proteinsequenzen vorhergesagt werden, erlaubt so die Identifizierung des Protein-Spots. Man bezeichnet dieses Verfahren auch als *peptide mass fingerprinting* (Abbildung 4). Die gebräuchlichste Methode zur Ermittlung der Massen der

Proteinfragmente ist die Massenspektroskopie mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer. Hierbei werden die Proteinfragmente, eingebettet in eine Matrix, mit einem Laserstrahl ionisiert und über die Bestimmung ihrer Flugzeit in einem elektrischen Feld ihre Masse errechnet. Weiterhin können Aminosäuresequenzen der Peptide erhalten werden, entweder nach dem klassischen Verfahren des Edman-Abbaus oder aber durch Tandem-Massenspektroskopie. Ein Vergleich der erhaltenen Teilsequenzen mit Einträgen in genomischen oder EST-Datenbanken kann daraufhin zur Identifizierung genutzt werden. Diese Technologie der Proteinanalyse wird am stärksten durch die visuelle Darstellung der 2D-Gele limitiert. Außerdem stellt, wie schon bei der DNA-Chipanalyse, die Heterogenität der Proben ein zusätzliches Problem dar.

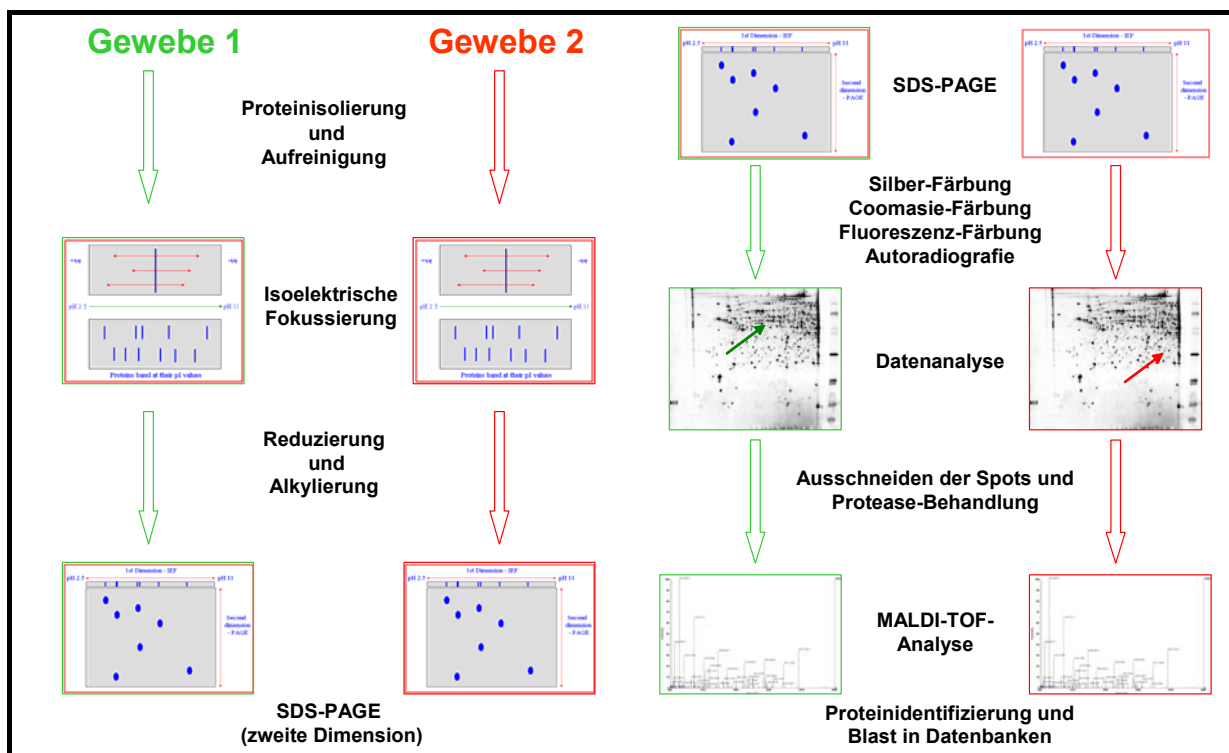


Abbildung 4: Schema der Proteomanalyse. Zuerst werden die Proteine von der zu testenden Probe isoliert und auf einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG) -Streifen für die isoelektrische Fokussierung, der ersten Dimension der 2D-Gelelektrophorese Technik, übertragen. Nach der Reduktion und Alkylierung wird die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese Technik, die Sodium-Dodecyl-Sulphat (SDS)-polyacrylamid Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Es gibt anschließend verschiedene Methoden unterschiedlichster Intensität (Silbernitrat-Färbung, Coomassieblau-Färbung, Fluoreszenzmarkierung, Autoradiografie), um die Proteine anzufärben und auf diese Weise sichtbar zu machen. Im Anschluss an die Bildanalyse werden interessante Spots aus dem Protein-Gel ausgeschnitten und mit spezifischen Proteasen verdaut, um sie dann mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektroskopie zu analysieren. Die auf diese Weise erhaltenen Spektren werden mit Proteindatenbanken verglichen, um die Proteine zu identifizieren (modifiziert nach (Pandey and Mann, 2000)).

B.1.3 Die Grenzen der 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ermöglicht es, auf einem einzigen Gel die Proteine einer Probe aufzutrennen, sichtbar zu machen und im Anschluss daran zu quantifizieren. Die Grenzen dieser Methode liegen vor allen Dingen in der Größe des Proteoms von Säugetieren. So kann mit Hilfe der Proteomanalyse nicht die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle erfasst werden, denn zu einem bestimmten Zeitpunkt wird in einem Gewebe nur ein Teil der im Genom kodierten Proteine exprimiert (zwischen 5.000–10.000) (Consortium 2004). Zusätzlich liegt die Anzahl der regulierten Proteine aufgrund unterschiedlicher zellulärer Lokalisation, Modifikation und Prozessierung um das 2 bis 3 fache höher. Mit qualitativ guten 2D-Gelelektrophoresegelelen ist es möglich, maximal 1.500-2.500 Proteine zu detektieren (Harder A., persönliche Mitteilung). So kann nur ein Teil der vorhandenen Proteine, nämlich nur die am stärksten regulierten in einer nicht vorher speziell behandelten Rohproteinmischung sichtbar gemacht werden. Proteine mit geringerer absoluter Quantität können somit nicht nachgewiesen werden. Dieses Problem kann mit Hilfe der Fraktionierung und der Reduzierung der Komplexität einer biologischen Probe optimiert werden.

C Chromosomale Co-Lokalisation von differentiell exprimierten Genen

C.1 Genregulation durch Anordnung von Genen in Genclustern

Die Anordnung von Genen in Clustern im Genom ist aus *Drosophila*, *C. elegans* und Vertebraten bekannt. Diese Art der Anordnung ermöglicht die gemeinschaftliche Regulation der Gene eines Clusters. Chromosomale Regionen co-exprimierter Gene konnten bereits mit Hilfe der Expressionsprofilanalyse in *C. elegans*, in *Drosophila*, im Mensch und in der Maus identifiziert werden. Beispielsweise wurde die Co-Regulation dicht miteinander gekoppelter Gene durch anteilige *cis*-regulatorische Elemente (solche wie LCRs, Enhancer, Repressoren, Insulatoren, MARs, SARs.) für Gen-Familienmitglieder wie *apoE*, *alpha-globin*, *beta-globin* und *Hox*-Gene beschrieben (Allan et al., 1997; Engel and Tanimoto, 2000; Li et al., 1999; Spitz et al., 2003). Im folgenden Kapitel wird stellvertretend für andere in Clustern angeordnete Gene auf das humane Apolipoprotein (Apo) -Gencluster näher eingegangen.

C.2 *Genregulation am Beispiel des Apo-Genclusters*

Das Apo-Gencluster hat eine Größe von 44 kb und umfasst die Gene (apo) E/C-I/C-IV/C-II, die alle in der gleichen transkriptionellen Orientierung innerhalb dieses Clusters angeordnet sind (Sorci-Thomas et al., 1989a; Sorci-Thomas et al., 1989b). Diese Gene teilen sich sowohl viele strukturelle als auch Sequenz-Gemeinsamkeiten (Allan et al., 1995), was vermuten lässt, dass sie evolutionär von einem Vorläufergen stammen. Die Gene des Apo-Clusters codieren für amphipathische, Lipid-bindende Proteine, die verschiedene Funktionen im Lipid-Metabolismus übernehmen (Brown et al., 1996; Mahley, 1988). Frühere Studien an der Maus lassen vermuten, dass apoE sowohl für das Wachstum von Neuronen verantwortlich ist, als auch eine pathologische Rolle bei der Alzheimer-Erkrankung spielt (Weisgraber and Mahley, 1996). Es konnte in transgenen Mäusen gezeigt werden, dass die Leber-spezifische Expression der humanen Gene des Apo-Clusters durch die koordinierte Funktion von zwei verschiedenen hepatischen Kontrollregionen (HCRs), die sich 15 kb (HCR.1) bzw. 26 kb (HCR.2) stromabwärts der apoE Gene befinden, bestimmt wird (Allan et al., 1997). Deletionsstudien an transgenen Mäusen, in denen HCR.1, HCR.2 oder beide Elemente entfernt wurden zeigten, dass das Vorhandensein von einem dieser Elemente für die Expression der Gene dieses Clusters ausreichte, und dass das Entfernen beider Enhancerelemente zum Fehlen der Genexpression führte. Außerdem konnte für das proximale Promotorelement keine Leber-spezifische transkriptionelle Aktivität festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die HCRs des Apo-Genclusters wichtige regulatorische Elemente für die Expression von Apolipoproteinen in der Leber darstellen (Allan et al., 1997).

C.3 *Genregulation durch nicht kodierende konservierte Elemente*

Es ist bekannt, dass ungefähr 20 % des Mausgenoms für Proteine kodieren und 40 % aus repetitiven Sequenzen bestehen. Man nimmt an, dass der übrige Anteil des Genoms unter anderem aus so genannten nicht kodierenden konservierten Elementen (*Non-genic (coding) Conserved Sequences, NCS*) besteht (Gaffney and Keightley, 2004; Shiroishi et al., 2005). Obwohl es sich bei den NCS-Elementen weder um Exons noch um repetitive Sequenzen handelt, sind diese DNA-Bereiche hoch konserviert. Die Funktion dieser Elemente war lange Zeit unbekannt. Es wurde vermutet, dass sie beispielsweise *cold spots* für Mutationen oder nicht-kodierende RNAs darstellen könnten. Die genregulatorischen Fähigkeiten der NCS wurden aber erst vor kurzem bestätigt. Es zeigte sich, dass ein NCS-Element einen über große

Distanzen wirkenden und Gen-spezifisch (auf *cis*-Ebene) agierenden Regulator darstellt, der beispielsweise für die Gliedmaßen-spezifische Expression von Sonic Hedgehog (*Shh*) verantwortlich ist (Sagai et al., 2005). Man fand heraus, dass sich dieses Motiv im Intron 5 des *Lmbr1*-Lokus, der 1 Mb von der *Shh*-kodierenden Sequenz entfernt ist, befindet. Mutationen in diesem Bereich führten zu präaxialer Polydactylie in der Maus und im Menschen. Frühere phylogenetische Studien konnten aufzeigen, dass diese Sequenz innerhalb der Tetrapoden und selbst im Knochenfisch hoch konserviert ist. Anhand einer Homologiesuche in den genomischen Sequenzdatenbanken konnte festgestellt werden, dass dieses konservierte Sequenzmotiv auch physikalisch mit der für *Shh* kodierenden Sequenz in Medaka (Japankärpfling) in Beziehung steht. Die Deletion dieser konservierten Intron-Sequenzen durch gezielte Mutagenese in der Maus führte zu einem vollständigen Verlust der *Shh*-Expression in der Schwanzspitze und zur Verkümmern distal zur Stylopod/Zygopod Grenzzone gelegener skelettaler Elemente. Diese Sequenz enthält demnach einen bedeutenden Gliedmaßen-spezifischen *Shh*-Enhancer, der für die Entwicklung distal gelegener Gliedmaßen notwendig ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die konservierte Intron-Sequenz, welche in den gemeinsamen Vorläufern der Fische und Tetrapoden entwickelt ist, für die Kontrolle der Flossen- und Gliedmaßen-Entwicklung verantwortlich ist (Sagai et al., 2005).

Ein weiteres, über große Distanzen wirkendes *cis*-regulatorisches Element wurde in der *local control region* (LCR) des β -Globin-Gens identifiziert und charakterisiert (Li et al., 1999).

Um funktionelle Einheiten innerhalb der Genomsequenzen verschiedener Organismen identifizieren zu können, wurde erst kürzlich eine groß angelegte, vergleichende genomische Analyse durchgeführt (Boffelli et al., 2004).

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse von Leber *versus* Niere wurden auch dazu verwendet, die Korrelation von co-regulierter Genexpression und Co-Lokalisation innerhalb des Genoms zu untersuchen.

D Analyse der Genregulation in der Promotorregion am Beispiel von *Dll1*

D.1 Das *Dll1*-Gen in der Maus

Das *Delta 1* (*Dll1*, *delta-like 1*)-Gen ist ein wichtiger Faktor für den geordneten Ablauf der Somitogenese, bei der das paraxiale Mesoderm des Rumpfes und des Schwanzes des Vertebraten Embryos segmentiert wird (Gossler and Hrabe de Angelis, 1998; Pourquie, 2000; Pourquie, 2003). Durch gezielte Inaktivierung des *Dll1*-Gens konnte gezeigt werden, dass die Expression im paraxialen Mesoderm für die Umwandlung des mesenchymalen präsomitischen Mesoderms in epitheliale Somiten, für die anterior-posteriore Kompartimentalisierung der Somiten und die Aufrechterhaltung der Somitengrenzen notwendig ist (Hrabe de Angelis et al., 1997). Hierbei ist die dynamische und kompartmentalisierte Expression von *Dll1* im präsomitischen Mesoderm (PMS) und in den Somiten von Bedeutung (Beckers et al., 1999; Bettenhausen et al., 1995).

Neben der bedeutenden Rolle von *Dll1* während der Somitogenese und der bereits beschriebenen Funktion von *Dll1* bei der Differenzierung von Nervenvorläuferzellen, ist *Dll1* außerdem in der Organogenese in verschiedenen Organanlagen wie Thymus, Niere, Lunge und Pankreas involviert. Außerdem konnte *Dll1* in der Retina nachgewiesen werden (Beckers et al., 1999). In mRNA-Extrakten von erwachsenen Mäusen wurden *Dll1*-Transkripte auch in der Lunge und im Herzen nachgewiesen (Bettenhausen et al., 1995).

Im nachfolgenden Kapitel steht die Regulation von *Dll1* während der Somitogenese im Vordergrund.

D.2 Der Promotorbereich von *Dll1*

Die dynamische Expression des *Dll1*-Gens in verschiedenen Geweben und Zellen unterschiedlichen Typs in der Maus ist ein Hinweis darauf, dass die zeitliche und räumliche Expression dieses Gens möglicherweise durch spezifische Transkriptionsfaktoren und deren Kombination gesteuert wird. Die transkriptionelle Regulation des *Dll1*-Gens, die zu diesem komplexen Genexpressionsmuster führt, wurde bereits in vorangegangenen Promotorstudien an transgenen Mäusen untersucht (Beckers et al., 2000). Mit dieser Analyse konnte zunächst gezeigt werden, dass genomische Sequenzen von 4,3 kb stromaufwärts der kodierenden Region ausreichen, um die wichtigsten Aspekte der *Dll1*-Expression von der Gastrulation bis zur frühen Embryogenese zu reproduzieren (Beckers et al., 2000). Allerdings findet eine

Restriktion der Expression von *Dll1* in den Somiten auf die caudalen Segmenthälften in transgenen Mäusen, im Gegensatz zur endogenen Expression, nicht statt. Infolge gelang es, putativ regulatorische Bereiche einzugrenzen, die die Expression eines Reporter-Transgens in Subdomänen der endogenen Expression leiten. Dabei ist es möglich, Elemente für die mesodermale Expression und die neuroektodermale Expression voneinander zu trennen. Die Experimente führten zu dem Ergebnis, dass die untersuchte Region von 4,3 kb stromaufwärts des Translationsstartpunktes aus mindestens zwei regulatorischen Elementen für neuronale Expression HI und HII (Homologieregion I und II zum Zebrafisch *delta d*-Gen), aus zwei Regionen, die eine Expression ins paraxiale Mesoderm lenken (MSDI und MSDII), sowie aus mindestens einem Element, das mesodermale Expression supprimiert, besteht (Beckers et al., 2000).

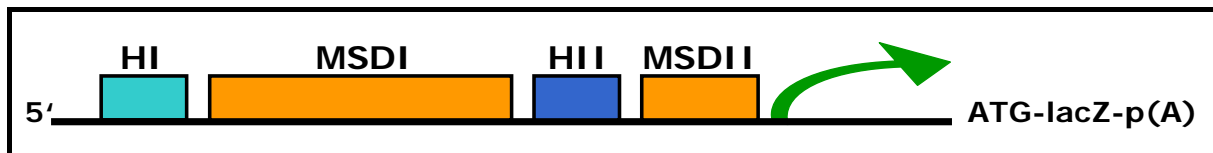


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Deletionsstudien zur Analyse von cis-regulatorischen Regionen innerhalb des *Dll1*-Promotors durch Analyse der Expression eines *LacZ*-Reportergens in transgenen Mäusen. Die *Dll1*-Promotorregion ist gekennzeichnet durch die beiden mesodermalen Enhancer MSDI (1500 bp) und MSDII (850 bp), die die Reportergenexpression im präsomitischen Mesoderm steuern. Zusätzlich ist MSDII noch für eine schwache Expression von *Dll1* im ventralen Neuralrohr verantwortlich. Die neuronale Expression von *Dll1* wird durch die Homologiebereiche HI und HII reguliert, HI = Homologieregion I, HII = Homologieregion II, MSD = mesodermal (Beckers et al., 2000).

Die mesodermalen Enhancer MSDI und MSDII stellen eine Basis für weitere Forschungen auf dem Gebiet der Somitogenese dar. So bietet sich die Erstellung von *Dll1*-Deletionsmutanten an, um die putativen regulatorischen Sequenzen zu identifizieren und zu analysieren und dadurch Rückschlüsse auf die Funktionsweise des *Dll1*-Gens schließen zu können (Abbildung 5). Außerdem ist es möglich, nach der genauen Lokalisierung der regulatorischen Sequenzen diejenigen Transkriptionsfaktoren zu ermitteln, durch die diese Enhancer aktiviert werden.

Außerdem wurde der mesodermale Enhancer für die Überexpression von *Dll1* im Mesoderm von transgenen Mäusen verwendet. In einer *Dll1*-überexprimierenden Maus ist die Expression von *Dll1* nicht länger auf die posterioren Kompartimente der Somiten beschränkt und die Expression im präsomitischen Mesoderm stärker. Die transgenen Mäuse zeigen Malformationen des axialen Skeletts, einschließlich offener Neuralbögen, vielfältige Fusionen verkürzter Wirbelkörper und fehlende intervertebrale Bandscheiben, die zu einer insgesamt

verkürzten Körpergröße der Tiere führen. Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen sowohl von Genen, die im Delta-Notch-Signalweg involviert sind, als auch von diversen Markergenen in jungen Embryonen (Tag 7,5 – 11,5 *p. c.*), zeigten kein anomales Expressionsmuster auf. Erste Unterschiede im Vergleich zu wildtypischen Nachkommen konnten ab Tag 12,5 *p. c.* beobachtet werden. Beispielsweise zeigten *Dll1*-defiziente Mäuse eine veränderte Musterbildung des Myotoms und zu einem späteren Zeitpunkt der Embryonalentwicklung eine verminderte Differenzierung von Chondrozyten. Um die Funktion des gleichen mesodermalen Enhancers *in vivo*- in seiner endogenen Position zu analysieren, wurde eine gezielte Methode eingesetzt, um dieses regulatorische Element in embryonalen Stammzellen (ES) zu eliminieren. Die Analyse dieser Mutanten zeigte, dass das mesodermale Enhancer-Element für die Expression und Funktion von *Dll1 in vivo* absolut erforderlich ist. Das Screening von 730 Hygromycin resistenten ES-Klonen mittels Southernblotanalyse ergab 4 positive Klone, von welchen bislang einer zu Bildung von Keimbahn kompetenten chimären Mäusen führte. Während die MSDI-Deletion von heterozygoten Mäusen normal erschien, zeigten Mäuse die homozygot in bezug auf die MSDI-Deletion waren, einen stabilen Phänotyp mit einigen fusionierten lumbalen Wirbeln und fusionierten Neuralbögen. Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen von homozygoten Embryonen junger Stadien (Tag 8,5 und 9,5 *p. c.*) zeigten ein weitgehend normales Expressionsmuster von *Dll1*, obwohl die Somiten unregelmäßig erschienen. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen durch weitere Experimente bestätigt werden. Dabei sind auch Experimente vorgesehen, die *in situ*-Hybridisierungen von anderen Genen, die im Delta-Notch-Signalweg zu späteren Entwicklungsstadien beteiligt sind, umfassen.

E Ziel dieser Arbeit

Es ist bekannt, dass Prozesse innerhalb einer Zelle durch Proteine und ihrer Interaktionen bestimmt werden, die wiederum von der Genregulation abhängig sind. Das Studium der Genregulation innerhalb einer Zelle setzt die Entwicklung und Etablierung von Methoden voraus, die es ermöglichen, zelluläre Regulationsprozesse besser zu verstehen. Eine Methode zur Analyse der Genexpression ist die RNA-Expressionsanalyse, deren Etablierung und Anwendung für die Untersuchung verschiedener Gewebe (z. B. Organe, Embryonen) aus unterschiedlichen Mausmodellen, innerhalb dieser Arbeit eine zentrale Stellung einnimmt.

(A) Im Rahmen dieser Arbeit gilt es zu untersuchen, ob mit Hilfe der RNA-Expressionsanalyse mittels DNA-Chiptechnologie im Mausmodell sowohl eine ausreichend umfangreiche als auch prinzipiell erfolgreiche Studie der genomumfassenden Genexpression möglich ist. Dabei sollen Vergleiche mit anderen etablierten Methoden Aussagen über die Verlässlichkeit der erzielten Ergebnisse liefern (RT-PCR, Echtzeit-PCR) und anhand ausgewählter Beispiele sollen die Grenzen der Sensitivität der Methode der RNA-Expressionsanalyse aufgezeigt werden. So stellen Experimente mit erwartungsgemäß massiven Transkriptomveränderungen (Anzahl regulierter Gene und Grad der differentiellen Regulation) möglicherweise geringere Ansprüche an die Nachweismethode zur Untersuchung der regulierten Transkripte. Experimente, bei denen dagegen mit geringen Transkriptomveränderungen zu rechnen ist, stellen die Grenzen der Sensitivität der Nachweismethode dar.

Im Speziellen soll untersucht werden, ob es möglich ist mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie signifikante Unterschiede in der Genexpression folgender Systeme festzustellen:

1. In Mausembryonen mit einem inaktivierten Gen.

Die RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp als Beispiel zur Identifikation neuer Gene des Delta-Notch-Signalwegs.

2. In Mausgehirnen mit einem gewebespezifisch inaktivierten Gen.

In diesem Fall wurden die RNA-Expressionsanalysen von Mausgehirnen (Tag 14 *p. p.*) mit gewebespezifisch ausgeschalteter *Thioredoxinreduktase 1* im Vergleich zu heterozygoten Tieren durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene nachweisen zu können.

3. In einem Gewebe zweier verschiedener Mausstämme.

In Zusammenarbeit mit der *German Mouse Clinic* (GMC) wurde die RNA-Expressionsanalyse als Teil einer Vielzahl von Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung von Mausstämmen (C3HeB/FeJ und C57BL/6J) angewandt, die als „genetischer Hintergrund“ für die Generierung von Mausmutanten dienen und deren nähere Beschreibung einen späteren Vergleich der einzelnen Mausmutanten miteinander ermöglichen soll.

4. In einem Gewebe der Maus, die mit einem Nahrungsergänzungsmittel supplementiert wird. Hierfür wurde der Effekt der Zugabe der körpereigenen Substanz Creatin auf die Genexpression im Mausgehirn studiert.

(B) Es ist bekannt, dass das Transkriptom und das Proteom auf hoch komplexe und kontrollierte Weise miteinander in Wechselwirkung stehen. Das Verständnis der

regulatorischen Wechselwirkungen zwischen Transkriptom und Proteom setzt ein vergleichendes Verfahren voraus, welches die simultane Aufzeichnung der Expression auf RNA- und Proteinebene erfordert. Um die generelle Durchführbarkeit einer solchen vergleichenden Genexpressionsanalyse zu erforschen, sollen an einem konkreten Beispiel RNA-Expressionsprofile mittels DNA-Chiptechnologie und 2D-Gelelektrophorese von adulten, männlichen Leber- und Nierengeweben der Maus durchgeführt und miteinander verglichen werden. Dieses Set von differentiellen Expressionsprofilen soll dazu verwendet werden, die folgenden zwei Hauptfragen zu beantworten:

- (1) korreliert die Proteinexpression mit der transkriptionellen Regulation für die meisten der differentiellen Proteine?
- (2) detektieren Transkriptomics- und Proteomicsmethoden funktionelle Kategorien mit verschiedenen Präferenzen?

(C) Die in (B) identifizierten differentiell exprimierten Gene sollen weiterhin hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation untersucht werden, um der Frage nachzugehen, ob

- (3) die co-regulierte Genexpression mit der Co-Lokalisation innerhalb des Genoms korreliert?

(D) Des Weiteren sollen klassische *in vitro*-Experimente dazu verwendet werden, um die Regulation von *Dll1 upstream* näher zu untersuchen. Hierfür soll in transgenen Mäusen (*Delta1*-Promotorstudien) versucht werden, Veränderungen im Expressionsmuster von *Dll1* zu detektieren, um daraus Rückschlüsse auf die Regulation des *Dll1*-Gens zu ziehen.

Im Detail sollen für die *Delta1*-Promotorstudie transgene Mäuse hergestellt und analysiert werden, in deren Genom ein Konstrukt integriert ist, das verkürzte, putativ regulierende Bereiche des MSDI-Elements des *Dll1*-Gens trägt und vor einem Reportergen (*LacZ*) inseriert ist. Die Bereiche des MSDI-Elements stellen putative Transkriptionsfaktorbindestellen dar, die zuvor in einer *in silico*-Analyse (GEMS-Launcher-Software, Genomatix) identifiziert wurden. Der Verlust an regulierenden Bereichen wird durch eine Farbreaktion (β -Galaktosidase) direkt in transgenen Mäusen als Resultat sichtbar gemacht. Es soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die charakteristische Expression von *Dll1* im Mesoderm beeinflusst werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

Material

Puffer und Lösungen

Alkalische Phosphatase-Puffer (frisch herstellen!):

1 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 1 M MgCl₂, 50 µl Tween20, 5 ml 1 M Tris-HCl pH 9,5, 2 mM Levamisol, auf 50 ml mit Wasser auffüllen.

Blockierungslösung (Ganzkörper-in situ-Hybridisierung):

Blockierungslösung (Roche Diagnostics – Boehringer) in MAB zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) auflösen, entweder durch Schütteln oder durch Erhitzen in einem Heizblock oder in der Mikrowelle. Diese Stocklösung autoklavieren (nach dem Autoklavieren 0,1 % Tween20 hinzugeben) und in Aliquots bei -20 °C lagern.

DEPC-H₂O:

0,01 % DEPC (50 µl/ 500 ml), gut mischen, über Nacht bei RT unter dem Abzug inkubieren, autoklavieren.

Färbelösung (Ganzkörper-in situ-Hybridisierung):

BM Purple AP Substrat, 2 mM Levamisole, 0,1 % Tween20, vor Gebrauch zentrifugieren, nicht das Pellet verwenden.

Heparin:

100 mg/ml Heparin (Sigma H3149) in DEPC

Hybridisierungspuffer (Ganzkörper-in situ-Hybridisierung):

50 % deionisiertes Formamid, 5x SSC, 5 µl Heparin Lösung, 0,1 % Tween20, pH 6

Hybridisierungspuffer (DNA-Chips):

50 % deionisiertes Formamid, 6x SSC, 0,5 % SDS, 5x Denhardt-Lösung

MAB:

11,6 g Maleinsäure (f.c. 0,1 mol/l), 8,8 g NaCl (f.c. 0,15 mol/l), Zugabe von 800 ml Wasser, pH 7,5 mit flüssigem NaOH einstellen, auf 1 Liter auffüllen.

MABT:

MAB + 0,1 % Tween20

PBS:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4

PBT:

PBS; 0,1 % Tween20, pH 7,4

PBT/Glycin (frisch herstellen):

2 mg/ml Glycin in PBT

4 % PFA/PBS:

4 g PFA, 100 ml 1x PBS-DEPC, einige Tropfen 10 N NaOH hinzugeben, auf 55 °C erwärmen bis das PFA gelöst ist, auf Eis abkühlen lassen, auf pH 7 mit HCl einstellen (Indikatorpapier).

4 % PFA / 0,2 % Glutaraldehyd in PBT:

4 % PFA/PBT, 400 µl 25 % Glutaraldehyd, auf 50 ml mit PBT auffüllen.

Prähybridisierungslösung (DNA-Chips):

6x SSC, 0,5x SDS, 1 % BSA

Proteinase K Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7, 0,5 mM EDTA, pH 7

RIPA:

0,05 % SDS, 75 mM NaCl, 5 ml NP40, 0,5 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 % Desoxycholat

RNase A:

RNase A (Sigma R4875) einer Konzentration von 10 µg/µl in 0,01 M NaAc (pH 5,2) auflösen, auf 100 °C für 15 min erhitzen, langsam auf RT abkühlen lassen, pH durch Zugabe von 0,1 Vol. von 1 M Tris-HCl pH 7,4 einstellen, in Aliquots bei -20 °C lagern.

RNase Lösung:

5 mM NaCl, 0,1 mM Tris HCl pH 7,5, 0,1 % Tween20

SSC (20x):

3,0 M NaCl, 0,3 M NaOAc, pH 7

SSC/FA/Tween20:

50 % deionisiertes Formamid, 2x SSC, 0,1 % Tween20

TAE:

40 M Tris-Ac, 1 mM EDTA, pH 8

Tail-Puffer:

5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,5 % Gelatine, 0,45 % NP40, 0,45 % Tween20

TE:

100 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8), pH 8

TBST:

137 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl pH 6,7

TBST/Levamisol:

2 mM Levamisol in TBST

Tris-HCl:

121,1g Tris-Base in 800 ml H₂O, mit HCl (32 %) einstellen, pH 7

Tris-HCl:

121,1g Tris-Base in 800 ml H₂O, 42 ml HCl (32 %), pH 8

tRNA:

10 µg/µl in DEPC Wasser, phenolisieren: 2x and in Aliquots bei -20 °C lagern

Zitronensäure:

1 M in DEPC Wasser

Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien wurden, bis auf die unten aufgeführten Ausnahmen, von der Firma Sigma bezogen

- Blockierungslösung (Roche Diagnostics / Boehringer)
- BM purple Ap Substrat (Boehringer #1442074)
- Chloroform, Ethanol, 2-Propanol, Xylol (Merck)
- Cy3 und Cy5 Mono-reaktive Fluoreszenzfarbstoffe (Amersham)
- dATP, dCTP, dGTP, dTTP (MBI Fermentas)
- DNA-Standardmarker: 100 bp, 1 kb (MBI Fermentas)
- Formamid, Phenol (Roth)
- Glycin (Amersham Biosciences)
- Glykogen (Roche)
- RNA-Standardmarker (MBI Fermentas)
- TEMED (Biorad)
- Tween (Fisher Scientific)

Enzyme

- Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas)
- Alkalische Phosphatase aus Kälberserum (Roche Diagnostics)
- DIG-Antikörper (Boehringer)
- Reverse Transkriptase Super Script II (Invitrogen)
- RNA-Polymerasen T3, T7 und SP6 (Roche)
- RNase A (Sigma R4875)
- Standard-Taq-Polymerasen (Biotherm)
- T4 DNA-Ligase, Quick T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
- Taq-Polymerasen (Pfu Ultra, Easy A und Herkulase zur Amplifikation großer PCR-Produkte oder Korrekturlesefunktionsaktivität (Stratagene))

Laboraausstattung

- Homogenisator: Heidoph DIAX 900
- Inkubator: WTB Binder, Hybaid Shake ,n' Stack
- Klonierungspistole: Tritech Research Cloning Gun Bactozapper
- Mikroskope: Leica MZ 95, Leica MZ APO, Zeiss Axioplan 2
- PCR-Maschinen: MJ Research PTC-200, Stratagene Robocycler Gradient 96
- Photometer: Eppendorf BioPhotometer
- SpeedVac: Uniequip Univapo 150ECH
- Termomixer: Eppendorf Thermomixer Comfort
- Wasserbad: B. Braun Thermomix BM
- Zentrifugen: Eppendorf 5415R, Eppendorf 5810R

Labor-Kit-Systeme

- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen)
- Rapid Ligation Kit (Roche)
- RNeasy Kit, Mini/Midi/Maxi Prep Kit, Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen)
- Wizard Plus Midiprep Kit (Promega)

Software

- BiblioSphere (Genomatix)
- GenePix Pro 3.0 (Axon Instruments)
- Genomatix Suite 3.3.0 (Genomatix)
- LabView (National Instruments)
- VectorNTI (Informax)
- MatInspector-Software (GEMS-Launcher, (Quandt et al., 1995) Genomatix)

Datenbanken/Internetreferenzen

- MGI-Datenbank (MouseBLAST): <http://mouseblast.informatics.jax.org/>
- USCS-Datenbank (BLAT Search Genome): <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?org=Mouse>
- Human Proteome Organisation (HUPO): <http://www.hupo2005.com/>
- Gen-Datenbank des NCBI (Genbank®): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
- Primer-Design (Primer3; Whitehead Institute for Biomedical Research): http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
- GEO-Datenbank (Gene Expression Omnibus): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>
- The Insitute for Genome Research (TIGR): <http://www.tigr.org/>
- Aminoallyl-Markierung von RNA für DNA-Chipanalyse: http://pga.tigr.org/sop/M004_1a.pdf
- PubMed-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Kompetente Zellen

Es wurden elektrokompente Zellen und chemisch kompetente Zellen von Stratagene (XL10-Gold Ultra kompetente Zellen, XL1-Blau kompetente Zellen, Elektro10-Blau Elektroporation-kompetente Zellen) und Invitrogen (TOP10 chemisch und elektrokompente Zellen) verwendet.

Mauslinien

- $Dll1^{LacZ/LacZ}$, $Dll1^{+/+}$; Mausstamm: C3HFeJ/He
- $Txnrd1^{flox/flox(Tg-Nes-Cre)}$, $Txnrd1^{wt/flox(Tg-Nes-Cre)}$; Mausstamm: CD-1
- $Dll1^{tgMSDI-B-}$ (MSDI-B, MSDI-B-2er/4er, MSDI-B-2er, MSDI-B-4er); Mausstamm: CD-1
- Wildtyp C3HeB/FeJ
- Wildtyp C57BL/6J

Mausgewebe

Die Zucht aller verwendeten Mäuse erfolgte unter spezifischen pathogen-freien Bedingungen. Die Gewebe wurden direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' – 3')
PROMOTOR-ANALYSE	
LacZ-1008-up4	CGG ATA AAC GGA ACT GGA AA
LacZ-1008-up5	ACC ACC GCA CGA TAG AGA TT
msdB-down2	TCC CTG GGT CTT TGA AGA AG
P1-4erModel-5'	CTC AAG GCT GAG GTG AGA AAG GCA G

P2-4erModel-3'	ATG GCC CAA CAC AGA TGA TTC TGC C
P3-msdB-5'	CAG GGA CTG TTT TTG CCA CG
P4-msdB-3'	TTT TTA CAC ATC CAT CAG ACA CT
P5-2erModel-5'	GTG TCT GAT GGA TGT GTA AAA ACC TAA
P6-2erModel-3'	CCC AGG ACA CAC GTA TCA CAA T
msdB-down	TTG TGA TAC GTG TGT CCT GGG
LacZ-up	ATC GGC GGA ATT CCA GCT GA
LacZ-up2	ATG CTA TTG CTT TAT TTG TAA CCA
LacZ-up3	AAC GGT AAT CGC CAT TTG AC
LacZ-up4	CGG ATA AAC GGA ACT GGA AA
LacZ-up5	ACC ACC GCA CGA TAG AGA TT
LacZ-up6	CCG TAA TGG GAT AGG TCA CG
P-LacZ-1	CCC CCT GAA CCT GAA ACA TA
P-LacZ-2	GCT CCA ATC CTT CCA TTC AA
M13Fow	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG
RT-PCR UND ECHTZEIT-PCR	
HPRT-5'	CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC
HPRT-3'	GTT GAA TAC AGG CCA GAC TTT GT
P-Ndrgl1a-5'	CGA GAG CTA CAT GAC GTG GA
P-Ndrgl1a-3'	TGC CAA TGA CAC TCT TGA GC
P-Ndrgl1b-5'	ACC TGC TAC AAC CCC CTC TT
P-Ndrgl1b-3'	CTG TTG TAG GCG CTG ATG AA
P-Nmyc1b-5'	TCC TGC TGG AAA AGG AGA AA
P-Nmyc1b-3'	ATA ATA CTG GCC GCA AGA GC
P-Ndrgl1-3'utr-5'	TCT TTG AGG CAG AGG GAG AA
P-Ndrgl1-3'utr-3'	GCC AAT GCT ACA AAC CCA GT
P-Ndrg2a-5'	CCG AGA CCT GAA CTT TGA GC
P-Ndrg2a-3'	CCA GTG CCC TGA TAA CAC CT
P-Ndrg2b-5'	GTT CGG GGA TAT GCA AGA GA
P-Ndrg2b-3'	CCT CGC TCA AAG TTC AGG TC
P-Ndrg3a-5'	CGC TTC AGA GTT CCT GGT TC
P-Ndrg3a-3'	CTC CAA CCC CAA TAC CAA TG
P-Ndrg3b-5'	GTT CCT ATA ATG GGC GCA GA
P-Ndrg3b-3'	TGC GTG AGT GAA AGG AAG TG
P-Nmyc1a-5'	GCG GTA ACC ACT TTC ACG AT
P-Nmyc1a-3'	GGC CTT TTT CAA GAT GAC CA
P-P4ha1a-5'	CAC ATT TCA GAA TGG AGA AAA ACA
P-P4ha1a-3'	GTG ACT GCA GGT TGT CCA GA
P-P4ha1b-5'	CAT TTC AGA ATG GAG AAA AAC AA
P-P4ha1b-3'	TCA GTG ACT GCA GGT TGT CC
P-D530020C15Rika-5'	TGG TGC CAG TGA TAG GAA CA
P-D530020C15Rika-3'	GCC ACT CAG GAG CAT GAT CTA
P-D530020C15Rikb-5'	TTT GGT GCC AGT GAT AGG AAC
P-D530020C15Rikb-3'	CAC TGA ATA AAT GCC ACT CAG G
P-Aldo1a-5'	CGC AGC CAG TGA ATC TCT C
P-Aldo1a-3'	AGT GGG CTG GAA GGG ATG
P-Aldo1b-5'	GCC CAG GAG GAG TAC ATC AA
P-Aldo1b-3'	GTG ATG GGA AAG AGC CTG AA
P-Hk2a-5'	GTG TGA CCT TGG GCA AAA CT
P-Hk2a-3'	AGA GTT GGG ACG TGT GTT CC
Hk2a-3'utr-5'	GGG TAG CCA CGG AGT ACA AA
Hk2a-3'utr-3'	GAG TGC CCA GGG ATA TGA GA
Hk2b-3'utr-5'	AGA ACG GGA AGA CAC CAA TG
Hk2b-3'utr-3'	ACT GCA GGT TGA GGG AGC TA
P-Slc16a3 a-5'	CAC TGC CTA GCA GGG TCT TC
P-Slc16a3 a-3'	AGA ACC ACA CAG CTC CTA GAG AC
P-Hig1-3'utr-5'	GGC AGC TGA CAA TGC AGA TA
P-Hig1-3'utr-3'	CCA GAA CCC ACA ACC AGT TT
P-Hig1a-5'	GCA CGT ACA GCA ACT TGG AA
P-Hig1a-3'	TTT GGG TTG GAC ATG GAT TT
P-2410006H16Rika-5'	CTG GAG ACT CCT CTG GGA AT
P-2410006H16Rika-3'	ATC ATC CCA CCA TGA GGT TG

P-2410006H16Rikb-5'	ATC ATG GGA TCG TGC TCT TC
P-2410006H16Rikb-3'	GCT GTT GGC AAT CTT CCA CT
P-2310056P07Rika-5'	CGG CTG GAC ATT GTC TTA GG
P-2310056P07Rika-3'	GTC TTT TCG CAG CCT TCT TG
P-2310056P07Rikb-5'	GCC TTA CTC CTG GGT TTT CC
P-2310056P07Rikb-3'	AAG ATC CTG CTG TGG TCA GG
P-Ldh1a-5'	ATG ACA CTT GGG TGG TTG GT
P-Ldh1a-3'	CCG ACG AGT TCC CAG TTA AG
P-Ldh1b-5'	GAC ACT TGG GTG GTT GGT TC
P-Ldh1b-3'	CTG GCT CCA GTG TGT ACG TC
P-Eno2a-3'utr-5'	ATC TCC GTG GCT TTG AAA TG
P-Eno2a-3'utr-3'	AAG CAG GCG GAT CTC TGT AA
P-Eno2b-3'utr-5'	ATC TCC GTG GCT TTG AAA TG
P-Eno2b-3'utr-3'	CCC TGT CTT GGG AAA CAA AA
P-Tpi-a-3'utr-5'	CCT CTA CCT GCC TGC ATA GC
P-Tpi-a-3'utr-3'	CTC ACT AGG AGC CAC CTT GG
P-Tpi-b-3'utr-5'	GAC ATC ATC TGC CCC ATC TT
P-Tpi-b-3'utr-3'	CTA TCC CAG GCC TCT TAG GG
P-Stc2a-5'	AGA AAA TGG ACA GCC TGG AG
P-Stc2a-3'	TGA GCG AGG GAG CAA AAG
P-Stc2b-5'	ATG GAC AGC CTG GAG GAA AG
P-Stc2b-3'	AGC AAA AGC CAC CCG AAT
P-Gpi1a-5'	ATG ACA CGT CAA AGC CCT TC
P-Gpi1a-3'	CCG TGT CCC TTC TCA CCA TA
P-Gpi1b-5'	AAG CCC TTC CAT CAG CTT C
P-Gpi1b-3'	TCC CTT CTC ACC ATA TGC AC
P-Mphosph6a-5'	CTC AGG ATT AAA CCC CCT GA
P-Mphosph6a-3'	GAA GAG GAG GAG CGG AAG AT
P-Mphosph6b-5'	GCA AAT CCA GGT ACC AGT GC
P-Mphosph6b-3'	CTC TGC AAG TGC GTC CAA C
P-Pfkl a-5'	AGG CTC TTT TCA GCC GTG T
P-Pfkl a-3'	GAG GGA TGT GGG GGT CTA CT
P-Pfkl b-3'	GGG GTC TAC TGT GCT GCT CT
P-Asnsa-5'	GCT GTC TCG ACC TTC AGA GC
P-Asnsa-3'	CCT CCC AGA AGT TTC CCT TC
P-Asnsb-5'	CAG AGC CGG AAG AAA CA
P-Asnsb-3'	GGC TGA TTG GCT GAC TCA TT
P-MG-4-2p9a-5'	TCC TCA GGT CAT GGT TCT CA
P-MG-4-2p9a-3'	GCA CCT TCA TCA ATG CCT TC
P-MG-4-146n10a-5'	CAG ATG CTC TCT TGG GAA CAA
P-MG-4-146n10a-3'	CTG CCT TCC AGA AGG TGG T
P-MG-4-146n10b-5'	ACC ATT GTT CAC AGG CAA GA
P-MG-4-146n10b-3'	ACA CAG GCT GCC TTC CAG
P-MG-4-148e12-5'	AGA AGA AAG GCA TTG CCA GA
P-MG-4-148e12a-3'	TGC ATG CCT CTC TGG ATA AA
P-MG-4-148e12b-5'	GAC CAA GAG GTA CAG GTG CAA
P-MG-4-148e12b-3'	GTG AGC ACC GTG TTG ACA TC
P-MG-4-145j12a-5'	GGT GCA AAG GAA AGA AGA AGG
P-MG-4-145j12a-3'	CCT TGC CTC TGT GAG CTA CC
P-MG-4-145j12b-5'	GGA AAG AAG AAG GGA CAT GG
P-MG-4-145j12b-3'	TGT GCA TGC CTC TCT GGA TA
P-MG-4-5j21a-5'	TGC TCG AGC GAA GTC TGT ATT
P-MG-4-5j21a-3'	TGC AGG AAC GTT CAT TTA GAA G
P-MG-4-5j21b-5'	ATG CTC GAG CGA AGT CTG TA
P-MG-4-5j21b-3'	CTG CAG GAA CGT TCA TTT AGA A
P-MG-4-3k8a-5'	TGT CCA AAG GAG GAA GCA GT
P-MG-4-3k8a-3'	TGG GAC ATG AGA TGC AGA AA
P-MG-4-3k8b-5'	CCC CAC CAG AAC AAC CTA GA
P-MG-4-3k8b-3'	TGC AGA CCA CAG TTC TAG CC
P-MG-4-147o3a-5'	AGG TAC AGG TGC AAG GGA GA
P-MG-4-147o3a-3'	CAC CCT GCC CGA TTT CAC
P-MG-4-147o3b-5'	GGT GCA AGG GAG AGA AGA AG

P-MG-4-3b2-5'	GGC TTT ATT CAA AGA CCA AGA GG
P-MG-4-3b2-3'	CCT CGC AAG TAC CGT TAA GC
P-MG-15-2141a-5'	TCA CCA TTT GTC ATC TGT CAG T
P-MG-15-2141a-3'	TGG TAA AGG AAG GCA ACA GG
P-MG-15-2141b-5'	GTT CAC CAT TTG TCA TCT GTC AGT
P-MG-15-2141b-3'	AGG AAG GCA ACA GGT ATT GG
P-MG-4-148e3a-5'	GGT ACA GGT GCA AGG GAG AG
P-MG-4-148e3a-3'	CTT CAA GCT CCT GAG CCA CT
P-MG-3-2p21-5'	TTT TTG GCC CCT CCT TTA GT
P-MG-3-2p21-3'	ACG TGA GCG AGA AAC CTT GT
P-MG-12-199n7-5'	GCG ACA TGT ACC TCC ATC CT
P-MG-12-199n7-3'	ACC CGA TGC AAG ATA AAA CG
DLI1-GENOTYPISIERUNG	
DeltaT-wt-5'	GAA GCC ACT GCA AGC TCT CT
DeltaT-wt-3'	CTG GCC TGG TAG TGC TTG AG
DeltaT-ko-3'	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT
DeltaT-ko-5'	GGA CTG AAA GCC AGA CGA AG
Dli1-links	CAA GGG CGT CCA GCG GTA C
Dli1-rechts	CCT TGC TAG GAC GCA GAG GG
LacZ3-rechts	GCA CCA CAG ATG AAA CGC CG
OLIGO-D(T)	
d(T) 15VN	TTT TTT TTT TTT TTT VN
d(T) 18VN	TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN
d(T) 21VN	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT VN
d(T) 25VN	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN

Methoden

DNA-Chiptechnologie

Das Klonset

Das Klonset, welches 20.500 Gen spezifische Sequenzen für DNA-Chips enthält, wurde von Lion Bioscience bezogen. Alle Klone enthalten 300-800 bp Inserts, die meist von der 3' untranslatierten Region eines Gen stammen. Die Sequenzen sind Poly-A-Enden frei. Stattdessen enthalten sie eine 150 bp Adapter-Sequenz. Die kodierende Region und repetitive Elemente wurden für die Klonselektion vermieden. Alle Insert wurden mittels Sequenz-Analyse verifiziert. Das komplette Klonset wurde mittels PCR amplifiziert und die Vollständigkeit der Produkte auf einem Agarosegel überprüft (Beckers et al., 2005; Seltsmann et al., 2005).

Fluoreszierende Farbstoffe (Dyes)

Lyophilisierte Fluoreszenzfarbstoffe Cy3TM und Cy5TM (Amersham) wurden im Dunkeln bei 4 °C gelagert und unmittelbar vor dem Gebrauch in 73 µl DMSO (Sigma) gelöst. Die überschüssige Markierungs-Lösung (Dye) ist nur wenige Wochen verwendbar und wurde bei -20 °C gelagert.

Isolierung, Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA

(Siehe: Methoden, Arbeitstechniken auf der Basis von Nukleinsäuren)

Markierungsprozedur des Targets

Die Markierungsreaktion, die für den 20.500-Chip verwendet wurde, ist indirekt. Während der reversen Transkriptionsreaktion wurden modifizierte aminoallyl-dUTPs in die cDNA inkorporiert. Im zweiten Schritt wurden die fluoreszierenden Cy3 oder Cy5, chemisch an die modifizierten aadUTPs gekoppelt. Die Markierungsreaktion erfolgte anhand des folgenden modifizierten TIGR (*The Institute for Genome Research*; <http://www.tigr.org/>) Protokolls (http://pga.tigr.org/sop/M004_1a.pdf).

Durchführung

20 µg Gesamt-RNA wurden in 0,2 µl PCR Reaktionsgefäße transferiert (auf Eis). Das Ansatzvolumen wurde auf 33 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. 4 µl Primer wurden hinzugefügt (0,1 mM Oligo-dT₂₅VN) und der Ansatz bei 70 °C, 5 min in PCR-Maschine inkubiert.

Master-Mix	
5x Erststrang-Puffer	6 µl
0,1 M DTT	3 µl
50x Aminoallyl-dNTP-Mix	0,6 µl
Superscript II (200U/µl, Roche Diagnostics)	2 µl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gekühlt und 23,2 µl Master-Mix dazu gegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 2-3 h bei 42 °C inkubiert, 5 min bei 70 °C Enzym inaktiviert und auf 37 °C abgekühlt. 20 µl 1 M NaOH und 20 µl 0,5 M EDTA wurden hinzugefügt und 15 min bei 65 °C RNA hydrolysiert. Das Reaktionsgefäß wurde kurz abzentrifugiert und 20 µl 1 M HCl zur Neutralisierung dazugegeben.

Aufreinigung von cDNA (*Qiagen QIAquick Nucleotide Removal-Kit*)

600 µl PB-Puffer wurden zum Reaktionsansatz dazugegeben und gut vermischt. Anschließend wurde der Ansatz auf den QIAquick-Filter gegeben und bei 14.000 Upm für 1 min zentrifugiert. Der Ansatz wurde dann mit 750 µl Phosphat-Wasch-Puffer gewaschen und 1 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und der Filter nochmals trocken zentrifugiert. Der Filter wurde mit 30 µl Elutions-Puffer versetzt und die cDNA-Lösung durch zentrifugieren vom Filter eluiert. Die cDNA-Lösung wurde in der Speedvac eingengt.

Markierung der cDNA mit Cy3 und Cy5 (*Test-cDNA*)

Die eingengte cDNA wurde in 4,5 µl 0,1 M Na₂CO₃-Lsg, pH 9,0 gelöst. 4,5 µl Cy3 (für Kontroll-cDNA) bzw. Cy5 (für Test-cDNA) wurden dazugegeben. Der Ansatz wurde im Dunkeln für 1h bei RT inkubiert. 25 µl 100 mM NaOAc, pH 5,2 wurden dazugegeben und gut vermischt.

Aufreinigung von markierter cDNA (Qiagen QIAquick Nucleotide Removal-Kit)

250 µl PB-Puffer wurden zum Reaktionsansatz dazugegeben und gut vermischt. Der Ansatz wurde auf den QIAquick-Filter gegeben und bei 14.000 Upm für 1 min zentrifugiert. Der Ansatz wurde dann mit 750 µl PE-Wasch-Puffer gewaschen und 1 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt und der Filter nochmals trocken zentrifugiert. Der Filter wurde dann mit 30 µl ddH₂O unter Zentrifugation 2x eluiert. Der Hybridisierungsschritt schloss sich direkt an. Alternativ ist eine Lagerung bei -20 °C möglich. Der Ansatz wurde während der gesamten Aufreinigung so wenig wie möglich dem Licht ausgesetzt.

Prähybridisierung und Hybridisierung des DNA-Chips

Zur Prähybridisierung wurden Objektträger und Glasdeckelchen in Prähybridisierungspuffer für 45 min bei 42 °C gegeben, danach zwei Mal in ddH₂O, einmal in Ethanol getaucht und anschließend an der Luft getrocknet. Zur Hybridisierung wurden Cy3 und Cy5 markierte cDNAs in einem 1,5ml Eppendorfgefäß miteinander kombiniert, bei 14.000 Upm, 5min zentrifugiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 2 µl Lachssperma DNA (10 µg/µl) und 20 µl Poly-dA (1 µg/µl, Sigma P-0887) wurden hinzugefügt. Die Ansätze wurden anschließend in der Speedvac für 1 h bei 45 °C eingengt. Zu jedem Ansatz 45 µl wurde vorgewärmter Hybridisierungspuffer gegeben und dieser in 0,2 ml PCR-Gefäße transferiert. Die Ansätze wurden für 5 min bei 95 °C denaturiert, 5 min bei 4 °C inkubiert (PCR Maschine verwenden) und kurz abzentrifugiert. Die Ansätze wurden dann auf die Objektträger gegeben, mit Deckgläschen abgedeckt und in die Hybridisierungs-Kammer gegeben. Die Ansätze in der Hybridisierungs-Kammer wurden anschließend für 16 h bei 42 °C inkubiert.

Prähybridisierungspuffer		Hybridisierungspuffer	
Endkonzentration	Ansatz	Endkonzentration	Ansatz
6x SSC	15 ml 20x SSC	50 % Formamid	500 µl Formamid
0,5 % SDS	2,5 ml 10 % SDS	6x SSC	300 µl 20x SSC
1 % BSA	5 ml 10 % BSA	0,5 % SDS	50 µl 10 % SDS
ddH ₂ O	27,5 ml ddH ₂ O	5x Denhardt's Lsg.	100 µl 50x Denhardt's Lsg.
		ddH ₂ O	50 µl ddH ₂ O

Waschschritte

Zwei Methoden zum Waschen der DNA-Chips kamen zum Einsatz, wobei keine größeren Unterschiede in der Qualität der Waschung festgestellt werden konnten. Es stellte sich lediglich heraus, dass die Methode ohne SDS etwas saubere, von Schlieren befreite DNA-Chips lieferte.

Waschschritte unter Verwendung von SDS

Es wurde 2x 5 min mit 2x SSC / 0,1 % SDS (50 ml 20x SSC, 10 ml 10 % SDS, 940 ml ddH₂O), 1x 5 min mit 1x SSC (5 ml 20x SSC, 10 ml 10 % SDS, 985 ml ddH₂O) und dann 1x

5 min mit 0,1x SSC (5 ml 20x SSC, 995 ml ddH₂O) gewaschen. Die DNA-Chips wurden durch Zentrifugation 3 min bei 700 Upm getrocknet.

Waschschritte ohne Verwendung von SDS

Alle Waschschritte wurden je einmal für 30 sec unter intensivem Schütteln mit folgenden Lösungen durchgeführt: 3x SSC, 1,5x SSC, 1x SSC, 0,5x SSC, 0,1x SSC. Anschließend wurden die DNA-Chips durch Zentrifugation 3 min bei 700 Upm getrocknet.

Bild-Analyse

Die getrockneten DNA-Chips wurden mit dem GenePix 4000A-Scanner gescannt und mit der GenePix Pro3.0-Bildbearbeitungssoftware (Axon Instruments) analysiert.

Normalisierung

Alle Spots, die mit der GenePix-Bildbearbeitungssoftware detektiert wurden, wurden für die Normalisierung verwendet. Bei einem DNA-Chip wie dem 20.500-Klon-Chip, welcher Gene von vielen verschiedenen funktionellen Klassen enthält, wurde angenommen, dass die meisten der Gene ihr Expressionslevel nicht veränderten und nur einige differentiell exprimiert sind. Daher wurden alle Gene und nicht nur die Haushaltsgene als Standard verwendet. Für jede Probe wurde der lokale Hintergrund von der mittleren Merkmalsintensität mittels der GenePix-Software subtrahiert.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit einem auf LabView-basierender Software, welche in der AG Beckers von Dr. Alexei Drobyshv entwickelt wurde.

Isolierung von Proteinen

Probenpräparation für die 2D-Gelelektrophorese

Für jeden Gradienten, pH 4-7 und 6-11, wurden unterschiedliche Präparationsprotokolle verwendet. Die Proben für Leber- und Nierengewebe wurden nach dem gleichen Protokoll, wie folgt behandelt:

Für den pH Gradienten 4-7 wurde das Gewebe (ungefähr 50 mg) in flüssigem Stickstoff zu einem homogenen Pulver verarbeitet. 10 mg des Pulvers wurden ohne es aufzutauen in 200 µl Lysispuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % DTT, 4 % CHAPS, 0,8 % Pharmalyt 3-10) aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend 10x für 2 s auf dem Schüttler vermischt und dann für 10 Zyklen mit einer Erschütterungszeit von 1 s (60 W) beschallt. Nach der Ultraschallbehandlung wurde der Ansatz für 30 min bei 25 °C weiter geschüttelt und dann für 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung (modifiziertes Bradford) durchgeführt. 250 µg Protein wurde auf jeden 4-7 IPG Streifen aufgetragen.

Für den pH Gradienten 6-11 wurden 15 mg Gewebepulver in 200 µl 4 °C kalten TCA/Aceton 20 (v/v) / 50 % (v/v) resuspendiert. Nach einer Ultraschallbehandlung für 15 min (30 W) in einem 4 °C kalten Wasserbad wurde die Suspension mit 1,2 ml TCA/Aceton 20 (v/v) / 50 % (v/v) verdünnt. Die Lösung wurde anschließend für 2 min auf dem Schüttler vermischt und dann für 16 h bei 4°C aufbewahrt und anschließend für 30 min bei 14.000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Das Pellet wurde 2-mal mit 200 µl Aceton gewaschen, in einem 4 °C Wasserbad für 20 min mit Ultraschallwellen behandelt, für 30 min bei 14.000 Upm (4 °C) zentrifugiert, in 200 µl Lysispuffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 2 % DTT; 4 % CHAPS, 0,8 % Pharmalyte 3-10) resuspendiert und 10-mal für 1 s (60 W) auf Eis mit Ultraschall behandelt. Der Ansatz wurde dann für 45 min bei RT weiter geschüttelt und dann 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und eine Proteinkonzentrationsbestimmung (modifiziertes Bradford) durchgeführt. 300 µg Protein wurde auf jeden 6-11 IPG-Streifen aufgetragen.

2D-Gelelektrophorese

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte mit 18 cm IPG (immobilisierte pH Gradienten) Streifen von Amersham Bioscience. Für jede Probe wurden 5 Gele mit pH Gradienten von pH 4-7 und 6-11 angefertigt. Der saure Gradient wurde mit 24 kVh und der basische Gradient mit 38 kVh durchgeführt. Nach dem Erreichen des *steady state*-Zustands wurden die Streifen mit SDS beladen und in DTT und Iodacetamid nach (Gorg et al., 2000)equilibriert.

Die zweite Dimension wurde als SDS-PAGE durchgeführt. T 12 % und C 2,8 % SDS Gele wurden gegossen und vertikal in einer Höfer ISO-Dalt Kammer unter Verwendung des Laemmli Puffersystems laufen gelassen. Die SDS-PAGE wurde gestoppt, wenn das Bromophenolblau aus den Gelen herausgelaufen war. In der Regel wurden zwischen 1.800 Vh und 2.000 Vh angewendet.

Gelfärbung und Spot-Quantifizierung

Nach der SDS-Elektrophorese wurden die Gele von den Glasplatten entfernt und mit Sypro Ruby TM entsprechend des Herstellerprotokolls gefärbt. Die mit Sypro Ruby TM gefärbten Gele wurden mit dem Fuji-Fluoreszenzscanner gescannt. Es wurden anschließend Mastergele von den fünf Originalkopien von jedem Gewebe und von jedem Gradienten hergestellt (ProteomWeaver, Definines). Statistische Kalkulationen erfolgten unter Berücksichtigung einer Standardabweichung von weniger als 30 % und ein Vertrauensbereich von $p < 0,05$ im T-Test. Zusätzlich wurden Coomassie gefärbte micropräparative Gele, die 500 µg Protein pro Gel enthielten, laufen gelassen, um Spots mit geringer differentiellen Expression zu detektieren.

Peptid-Massenspektroskopie (PMF MALDI-TOF)

Die Identifizierung der ausgewählten Proteinspots erfolgte mittels Peptid-Massenspektroskopie ((PMF)-MALDI-TOF) -Analyse.

Für die Peptid-Massenspektroskopie wurden die Spots von den SDS Gelen gepickt, 3-mal mit 10 mM NH_4HCO_3 , 30 % ACN gewaschen und über Nacht in 5 μl Trypsinpuffer bei 37 °C inkubiert. Der Trypsinpuffer enthält 25 ng/ml Trypsin (Roche) gelöst in 10 mM NH_4HCO_3 und besitzt einen pH von 8. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 20 min in ein Ultraschallbad von 25 °C gegeben. Der Überstand wurde entfernt und in der SpeedVac aufkonzentriert. Zum Entsalzen wurde die aufkonzentrierte Lösung durch eine C18 reversed phase ZipTip Säule von Millipore gegeben. Der Elutionspuffer enthält 0,1 % TFA und 80 % Acetonitril. Die eluierten Peptide wurden dann mit der gleichen Menge an Dihydroxybenzoesäure co-kristallisiert. Die MALDI-TOF -Analyse (Applied Biosystems Voyager STR) wurde in einem Peptidbereich von 700 bis 4.000 Dalton durchgeführt. Die erhaltenen Spektren wurden mittels der Profound Software (Genomic Solutions) mit der NCBI Datenbank verglichen, um die korrespondierenden Proteine zu finden.

Allgemeine Methoden zur Arbeit mit Prokaryonten (E. coli)

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Bei der Transformation wird die Zellmembran von Bakterien kurzzeitig durchlässig gemacht, so dass Plasmide in die Bakterien eindringen können. Diese werden dann im Zuge der Vermehrung der Bakterien vervielfältigt. Die Plasmide enthalten Resistenzgene, die die transformierten Bakterien auch in der Gegenwart von Antibiotika (z. B. Ampicillin) wachsen lassen. So können Bakterien, die Plasmide tragen, selektioniert werden.

Für die Transformation von Plasmid-DNA in prokaryotische Zellen (*E. coli*) wurden 100 μl kompetente Zellen und das zu transformierende Plasmid (im Allgemeinen bei vorangegangener Ligation der Ligationsansatz) eingesetzt.

Durchführung:

100 μl Aliquot kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 μl des Ligationsansatzes, bzw. mit 1-2 μg rekombinanten Plasmid vermischt, für 30 min auf Eis inkubiert, für 90 sec einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt (Hitzeschock), für 2-3 min auf Eis gekühlt und dann wurden 500 μl LB-Medium hinzu gegeben. Der Ansatz wurde für 1 h im Heizblock bei 37 °C inkubiert und dabei leicht geschüttelt. Bei Plasmidvektoren mit Blau-Weiß-Selektion wurden zusätzlich 40 μl IPTG und X-Gal hinzu gegeben. 300 μl des Transformationsansatzes wurden auf vorgewärmte LB-Amp-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und die Lagerung bei 4 °C.

Transformation elektrokompenter Zellen

Für die Transformation von elektrokompente Zellen wurden 0,1-2 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die TOP10 elektrokompente Zellen (Invitrogen) und die Küvetten (Pipetropdes TM) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die DNA zu den elektrokompenten Zellen gegeben und vorsichtig vermischt. Nachfolgend wurde die Küvette in eine Bactozapper Cloning Gun gegeben und die Zellen vorsichtig in die Küvette gesaugt. Der elektrische Impuls wurde durch Betätigung des Impulsgebers ausgelöst. Dann wurden die Zellen in 0,5 ml einer eiskalten 15 % Glycerol-Lösung gegeben. Die Zellen (10-50 µl) wurden daraufhin sofort auf LB-Agarplatten ausplattiert.

Klonierung mit dem Topo-TA-Cloning-Kit (Invitrogen)

Die Taq-Polymerase besitzt eine vom DNA-Template unabhängige Aktivität, die sie befähigt, einzelne Desoxynukleotide, prävalent Adenosine, an das 3' Ende von PCR Produkten zu hängen. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem Topo-TA-Cloning-Kit zu nutze. Die Klonierung des PCR-Produkts erfolgte in einen vom Hersteller gelieferten linearisierten pCR II TOPO Vektor, welcher an den 3' Enden einzelne Deoxythymidine trägt (T). Dadurch wurde eine effiziente Ligation des PCR-Inserts mit dem Vektor (Basenpaarung der überhängenden Nukleotide Adenin bzw. Thymidin) möglich. Der Transformationsansatz zur Selektion von Transformanden wurde auf LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin (50 mg/ml) ausplattiert. Zur Identifizierung von Bakterien, die den Vektor mit dem integrierten PCR-Insert enthalten, diente die Blau-Weiß Selektion.

Durchführung:

Das zu klonierende DNA-Template wurde mittels PCR amplifiziert (maximal 35 Zyklen). Es können 10-100 ng DNA in einem 20 µl PCR-Ansatz eingesetzt werden. Der Erfolg der PCR wurde anschließend anhand eines 5 µl Aliquots auf einem 1 % Agarosegel überprüft. Dann erfolgte die Ligation mit dem TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen. Der folgende Ligationsansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert:

Ansatz	
PCR-Insert	2 µl
Reaktionspuffer inklusive pCR II TOPO-Vektor	1 µl
H ₂ O	2 µl

Für die Transformation in kompetente *E. coli Top10 F'* Zellen (Invitrogen) wurden 2 µl des Ligationsansatzes eingesetzt. Die Durchführung erfolgte, wie unter „Methoden, Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA“ beschrieben. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit Kanamycin oder Ampicillin, IPTG und X-Gal ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

Charakterisierung der transformierten Bakterien (Blau-Weiß-Selektion)

Die Blau-Weiß Selektion dient zur Identifizierung von Bakterien, die Plasmide mit Insert tragen. Einige Plasmide besitzen Klonierungsstellen, bei denen die Integration von Fremd-DNA zur Unterbrechung des β -Galaktosidase-Gen Promotors führt. Werden Bakterien mit solchen Fremd-DNA tragenden Plasmiden transformiert und auf LB-Platten ausplattiert, die mit dem chromogenen Farbstoff X-Gal vorbehandelt worden sind, so können diese Bakterien an ihrer weißen Farbe erkannt werden (sie können das X-Gal nicht mehr umsetzen). Die Bakterien, welche mit intakten integrationslosen Plasmiden transformiert wurden, können das X-Gal umsetzen und werden blau. Bakterien, welche den Repressor für das β -Galaktosidase Gens exprimieren, müssen zusätzlich zu X-Gal noch auf dem Induktor IPTG ausplattiert werden. IPTG inhibiert den Repressor und ermöglicht so die Transkription des β -Galaktosidase-Gens.

Lagerung von Bakterien

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerinstocks hergestellt (50 % Glycerin/50 % Bakterienkultur), die in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

Plasmid Mini-Präparation

Für eine DNA-Sequenzierung wurde reine Plasmid-DNA benötigt, welche mit dem QIAprep Spin columns Miniprep Kit aus Bakterienkulturen erhalten wurde.

Durchführung:

3 ml einer Übernachtskultur wurden bei 14.000 U/min 1 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in 250 μ l P1 Puffer resuspendiert. Es wurden 250 μ l P2 Puffer und 350 μ l N3 Puffer hinzu gegeben und mit der Lösung vermischt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend noch einmal 5 min wie oben zentrifugiert und dann auf eine *Spin column* gegeben und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend mit 500 μ l PB Puffer versetzt (Waschschritt). Es wurde wie oben angegeben zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Die Säule wurde anschließend erneut mit 750 μ l PE Puffer versetzt (Waschschritt), wie oben zentrifugiert, danach das Filtrat verworfen. Letzterer Schritt wurde wiederholt, um restlichen Puffer zu entfernen. Die Säule wurde auf ein neues Eppendorfgefäß gegeben und die Säule mit 50 μ l EB bzw. TE Puffer versetzt (Elution). Vor dem Zentrifugieren wurde 1 min gewartet. Die DNA Konzentration des Eluats wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt.

Plasmid Midi- bzw. Maxi-Präparation

Plasmide, die dem erwünschten Ergebnis entsprechen, wurden in größerem Maßstab und höherem Reinheitsgrad für Lagerung sowie weitere Anwendungen wie Sequenzierung oder Sondenisolation über Restriktionsverdau isoliert. Dazu wurde der QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Kat.-Nr.: 12163) oder das Wizard® Plus Midiprep DNA Purification System (Promega, Kat.-Nr.: A7640) in Kombination mit der Vac-Man®-Saugvorrichtung (Promega) auf Grundlage der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das verwendete Kulturvolumen betrug 50 - 100 ml. Es wurde eine Ausbeute von zumeist 300 - 500 µg DNA erreicht.

Arbeitstechniken auf der Basis von Nukleinsäuren

Alle Arbeiten mit RNA sollten mit Handschuhen und unter der Verwendung von DEPC-Wasser durchgeführt werden, um einer Degradierung der RNA durch RNasen vorzubeugen.

Isolierung von Gesamt-RNA mittels RNeasy Kit

Zur Isolierung von RNA aus Zellen oder Gewebe wurde der RNeasy™ Kit (Mini, Midi oder Maxi) (Qiagen; Kat-Nr. 74104) verwendet. Die Methode basiert auf der mechanischen und chemischen Lyse der Zellen bzw. Gewebe in Guanidinium Isothiocyanat-Puffer (Chomczynski and Sacchi, 1987). Das dafür verwendete Dispergiergerät führt durch seine schnelle Rotation zusätzlich zur Scherung der genomischen DNA. Das Gewebe oder vereinzelte und präzipitierte Zellen wurden nach vorherigem Schockgefrieren für 30 - 120 s bis zum Erhalt eines klaren Lysats dispergiert. Das Lysat wurde im Anschluss auf die dem Kit beigegebenen Säulen appliziert, an die die RNA ab einer Größe von 200 bp selektiv bindet. Kontaminierende Komponenten wurden durch zweimaliges Waschen entfernt und die RNA abschließend mit Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch über die OD₂₆₀. Bei RNA entspricht eine Absorptionseinheit bei 260 nm (OD₂₆₀) 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989). RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Denaturierende RNA-Gel-Elektrophorese

Zunächst wurde die Gelkammer für 2 h mit 0,1 M NaOH inkubiert, um sie von RNasen zu befreien. Für ein 1,5 %iges Gel wurde 1,5 g Agarose in 60 ml DEPC-Wasser gelöst und auf eine Temperatur von 60 °C gebracht. Dann wurden 20 ml 5 x Laufpuffer und 17,9 ml Formaldehyd (37 %) zugegeben und das Gel in die Kammer gegossen. Die RNA-Proben wurden folgendermaßen vorbereitet:

Ansatz	
RNA (1-2 µg)	4,5 µl
5 x Laufpuffer	2,0 µl
Formaldehyd	3,5 µl
Formamid	10 µl

Dann wurde der Ansatz bei 65 °C für 15 min erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Nach der Zugabe von 2 µl Lade-Puffer und 2 ng/µl Ethidiumbromid (EtBr) wurden die Proben auf das mit 1x Laufpuffer überschichtete Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 20 V.

Herstellung von cDNA (Reverse Transkription)

Für die Herstellung von cDNA aus einem RNA-Template wurde die RNA mit Hilfe der Superscript II (Roche Diagnostics) und random- (GIBCO) oder oligo (dT)-Primern (GIBCO) revers transkribiert.

Durchführung:

3-10 µg RNA und 100 pmol Primer wurden mit dest. H₂O auf ein Endvolumen von 11 µl gebracht. Es folgte die Denaturierung bei 70 °C für 10 min, dann wurde der Ansatz auf Eis für 15 min abgeschreckt. Für die reverse Transkription wurden dann folgende Bestandteile hinzu gegeben:

Master-Mix	
5x RT-Puffer	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
RNase Inhibitor (40 U/µl, Promega)	1 µl
Superscript II (200 U/µl, Roche Diagnostics)	1 µl

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 60 min inkubiert. Die RNA wurde mit 2 µl 1M NaOH bei 70 °C für 15 min entfernt und die Lösung mit 2 µl 1 M HCl neutralisiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Für jede PCR-Reaktion wurde 1 µl cDNA als Template eingesetzt.

Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

1 µg Gesamt-RNA wurde für eine Reverse Transkription-Reaktion eingesetzt. Dabei wurden statt üblicherweise Poly-dT-Oligonukleotide Random, Hexamere (Roche) verwendet. Die so hergestellte cDNA repräsentiert nicht nur die 3' Endbereiche, sondern rein zufällig amplifizierte Regionen. Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mittels des Qiagen Nucleotide Removal-Kits und die Endkonzentration wurde auf 10 ng/µl eingestellt. Diese cDNA wurde nun als Template für eine PCR verwendet:

PCR-Ansatz (50 µl Reaktionsvolumen)	
10x PCR Puffer	5 µl
50 mM MgCl ₂	3 µl
10 µM Forwärts-Primer	1,5 µl
10 µM Rückwärts-Primer	1,5 µl
25 mM dNTP-Mix	0,5 µl
H ₂ O	37 µl
cDNA Template	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl

Standard-PCR-Reaktion:				
1 Zyklus		30 Zyklen		1 Zyklus
95 °C	5 min	95 °C	30 s	72°C 5 min
		x °C	45 s	
		72 °C	45 s	
x °C: Annealing-Temperatur ausgewählt anhand der Primer-Sequenz				

Echtzeit-PCR (RealTime-PCR)

Die Echtzeit-PCR wurde mit der oben beschriebenen cDNA durchgeführt. Die Echtzeit-PCR erfolgte nach folgendem Ansatz:

RealTime-PCR -Ansatz	
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	25 µl
ROX Reference Dye	1 µl
Forwärts-Primer	1 µl
Rückwärts-Primer	1 µl
H ₂ O	21 µl
cDNA Template	1 µl

Die Reaktion wurde in einem ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt.

RealTime-PCR-Reaktion:				
1 Zyklus	1 Zyklus		45 Zyklen	
50 °C 2 min	95 °C	2 min	95 °C	15 s
			55 °C	30 s
			72 °C	30 s

cDNA Aufreinigung

Vor dem Beginn der Aufreinigung wurde Nuklease-freies Wasser auf 50 °C erwärmt. Dann wurde eine Filter-Säule pro Ansatz für 5 min durch Zugabe von 100 µl cDNA Bindungspuffer äquilibriert. Anschließend wurden 250 µl cDNA Bindungspuffer zu jedem Ansatz gegeben und durch vorsichtiges vortexen mit dem Reaktionsansatz gemischt. Der cDNA Ansatz/cDNA Bindungspuffer Mix wurde dann auf die vorbereitete Filter-Patrone gegeben und für 1 min bei 10.000x g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Dann wurden 650 µl cDNA Waschpuffer auf jede Filter-Säule gegeben und erneut für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Reaktionsansätze erneut bei hoher Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Filter-Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 50 µl vorgewärmtes H₂O auf den Filter gegeben. Nachdem der Filter für 2 min bei RT inkubiert wurde, wurde für 1 min zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde wiederholt. Das Eluat enthielt die aufgereinigte cDNA. Der Ansatz wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert bis das Volumen 8 µl oder weniger betrug. Dabei war es wichtig, dass der Ansatz nicht vollständig getrocknet wurde. Die Ansätze wurden sofort für die DNA-Chip Hybridisierung verwendet.

Konzentrationsbestimmung und Beurteilung der Reinheit von Nukleinsäuren

Die Konzentration wässriger DNA-Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm mit Hilfe eines UV-Spektralphotometers vermessen. Bei dieser Wellenlänge liegt sowohl für einzel- als auch für doppelsträngige DNA das Absorptionsmaximum. Eine OD bei 260 nm von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA bzw. von 37 µg/ml für einzelsträngige DNA. Eine Vergleichsmessung wurde bei 280 nm durchgeführt und das Verhältnis OD 260 nm : OD 280 nm berechnet. Bei reinen Nukleinsäuren wurde ein Wert größer als 1,8 erhalten. Zur Überprüfung der photometrisch ermittelten Messergebnisse, zur Kontrolle der Reinheit und zum Abgleich kleinster DNA-Mengen wurden entsprechende DNA-Lösungen zusammen mit Referenzproben bekannter Konzentration auf Agarosegelen co-elektrophoretisiert. Anhand der fluoreszierenden Eigenschaft von Ethidiumbromid unter UV-Licht war es möglich, die Konzentrationen der einzelnen DNA-Lösungen anhand der Fluoreszenzintensitäten miteinander zu vergleichen.

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Hydrolyse von DNA erfolgt mit Restriktionsenzymen. Diese Enzyme erkennen kurze Nukleotid-Sequenzen, an denen sie den DNA-Strang schneiden. Um ein optimales Spaltungsergebnis zu erzielen, muss diese enzymatische Reaktion in einem vom Hersteller mitgelieferten Enzympuffer bei einer für das Enzym optimalen Temperatur erfolgen. In der Regel sind das 37 °C. Anhand der zu erwartenden Schnittstellen und der zu schneidenden DNA-Menge kann die für die Spaltung einzusetzende Enzymaktivität abgeschätzt werden. Es ist bekannt, dass 1 Unit einer Endonuclease 1 µg λ-DNA bei 37 °C innerhalb einer Stunde verdaut.

Standardgemäß wurde folgender Restriktionsansatz für 2 h inkubiert und im Anschluss an die Inkubationszeit, zur Kontrolle des enzymatischen Verdaus, auf ein Agarosegel aufgetragen:

Restriktionsansatz	
DNA	1,0 µg
Restriktionsenzym [10 U/µl]	0,5 µl
10x Enzympuffer	1,0 µl
10x BSA (falls erforderlich)	1,0 µl
bidest. H ₂ O	ad. 10 µl

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen diente zum Beispiel dazu, Plasmidvektoren mit geeigneten Endonucleasen zu linearisieren und sie so für die Aufnahme von Insert-DNA vorzubereiten. Dafür sind die Vektoren mit einer Polylinkerregion (*multiple cloning site*) ausgestattet, die Schnittstellen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen enthalten. Die Restriktionsenzyme können Schnittstellen mit überhängenden DNA-Enden (*sticky ends*) oder glatten DNA-Enden (*blunt ends*) liefern. So ist es möglich, die verschiedensten DNA-Fragmente in Plasmidvektoren zu klonieren.

DNA-Präzipitation

Durch Zusatz von Ethanol können Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden. Die Alkalisalze von DNA und RNA sind in 70 % Ethanol praktisch unlöslich, da die geladenen Phosphat- Phosphatdiestergruppen nicht mehr ausreichend hydratisiert vorliegen. Dieser Effekt kann durch Zugabe löslicher Salze, die mit den Nukleinsäuren um die Hydrathülle konkurrieren, zusätzlich verstärkt werden. Daher wurden zu einer wässrigen Nukleinsäurelösung 0,1 Vol 3M NaOAc (pH 5,5) sowie 3 Vol. 96% Ethanol gegeben, der Ansatz gemischt und 15 min bei -80 °C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Ausgefallene Salze wurden durch Waschen des Präzipitats mit 70 % Ethanol entfernt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Nukleinsäuresediment an der Luft oder im Wasserstrahlvakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen an H₂O aufgenommen.

Ansatz:

	X µl DNA/Plasmid etc
+	2,5x X µl 100 % Ethanol
=	Y
+	1/10 Vol Y 3M NaOAc

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei -80 °C oder für mindestens 2 h bei -20 °C inkubiert.

DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Ein sehr wichtiges analytisches Verfahren der modernen Genetik ist die Gelchromatographie, mit der DNA-Fragmente nach ihrer Länge in einem Spannungsfeld aufgetrennt werden können. Fragmente größerer Länge laufen in dem elektrischen Feld langsamer in Richtung des positiv geladenen Poles als solche mit geringerer Anzahl an Basenpaaren. Je nach Länge der zu erwartenden DNA-Fragmente wurden Agarose/1x TBE-Gele mit einem Anteil von 0,5 % (gute Auftrennung großer Fragmente von 1-10 kb) bis zu 1,5 % (gute Auftrennung kleiner Fragmente von 0,1-2 kb) Agarose verwendet. Zur Herstellung wurde je nach gewünschter Prozentigkeit des Gels Agarose in 1x TBE Puffer aufgekocht und mit 0,1 µl Ethidiumbromid/ml Gellösung versetzt, welches mit der DNA interagiert und diese unter UV-Licht sichtbar machte. Das flüssige Gel wurde dann in eine mit einem Probenkamm versehene Gelkammer gegossen. Das Gel war nach dem Aushärten einsatzbereit. Die zu analysierenden Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an 6x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Elektrophoresepuffer wurde ebenfalls 1x TBE verwendet. Die für die Gelelektrophorese anzulegende Spannung und Stromstärke richtete sich zum einen nach dem Abstand der beiden Gelkammerelektroden zueinander und zum anderen nach der beabsichtigten Auftrennungsgenauigkeit der DNA-Banden. Normalerweise erfolgte die Elektrophorese bei 30-120 V. Die Größenzuordnung der verschiedenen Fragmente erfolgte mit Hilfe eines Markers, dessen Auftrennung eine bekannte Längenverteilung lieferte (z. B. λ-Hind III geschnittene DNA oder SMART-Marker (100 bp-Marker).

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegel stehen eine Reihe von Techniken und Kits verschiedener Anbieter zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die Elution der DNA aus Agarose mit dem QIAquick Gel-Extraktionskit von QIAGEN durchgeführt. Dieses Protokoll ist für die Extraktion von 70 bp bis 10kb großen DNA-Fragmenten aus Standard-Agarosegelen in TAE oder TBE Puffer ausgelegt. Mit einer Säule des Gel-Extraktionskits können maximal 10 µg DNA aufgereinigt werden. Die Durchführung ist dem QIAGEN Handbuch zu entnehmen. Die so isolierte DNA wurde direkt für weitere Ansätze eingesetzt, z.B. für Ligation, Labelling-Reaktion.

Ligation von DNA

Der Einbau von zumeist aufgereinigten Restriktionsfragmenten, PCR-Produkten oder synthetisch hergestellten Oligonukleotiden in Vektoren erfolgte unter Verwendung rekombinanter Phagen-T4-Ligase. Plasmid-Vektor und Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:10 bis 1:3 eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte dann bei 16 °C ü. N. in einem 20 µl-Ansatz, dem 5 U T4 DNA-Ligase (Roche, Kat.-Nr.: 799009) zugegeben wurde. Die Gesamtmenge der eingesetzten DNA betrug 0,1-1 µg. Bei Bedarf wurden auch überhängende Enden aufgefüllt. Um die Ligation effizienter zu machen, wurden die Enden des Vektors gegebenenfalls dephosphoryliert.

Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des Vektors, der mit nur einem Enzym für die Klonierung geschnitten wurde, zu vermeiden und damit die Menge nicht rekombinanter Transformanden zu verringern bzw. die Ligation effektiver zu gestalten, wurde der Vektor vor der Aufreinigung über das Gel dephosphoryliert. Hierfür wurde der Vektor mit der Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP, 1U/µl) von Roche Diagnostics behandelt. Die Reaktion erfolgte nach folgendem Ansatz:

Dephosphorylierungsansatz	
linearisierte DNA (10 µl eines Restriktionsansatzes)	1 µg
10x Phosphatasepuffer	2 µl
Alkalische Phosphatase (1 U/µl)	2 µl
bidest. H ₂ O	ad. 20 µl

Der für die Ligation vorbereitete Vektor wurde über ein Agarosegel aufgereinigt.

Ligation überhängender DNA-Enden

Folgender Ansatz wurde für die Ligation überlappender (*sticky*) Enden verwendet:

Ligationsansatz	
Vektor	50 ng
Menge Insert in Mol	3fache
10x Ligasepuffer (Roche Diagnostics)	1 µl
T4 DNA-Ligase (5U/µl, Roche Diagnostics)	1 µl
bidest. H ₂ O	ad. 10 µl

Die Ligation fand bei RT für 1-2 h statt.

Ligation kohäsiver DNA-Enden

Der Ligationsansatz für kohäsive (*blunt*) DNA-Enden wurde wie oben beschrieben angesetzt. Allerdings wurde bis zur 10 fachen Menge an Insert verwendet. Die Ligation erfolgte bei 14 °C ü. N. Ein Teil des jeweiligen Ligationsansatzes wurde dann in Bakterien transformiert.

Amplifikation von DNA mit der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt. Dieser Vorgang bestand aus drei Reaktionsschritten. Im ersten Schritt wurde die Template-DNA zusammen mit den Starter-DNA-Fragmenten bei 95 °C für 40 sec denaturiert. In dem darauf folgenden Schritt lagerten sich Starter-Moleküle bei einer spezifischen Temperatur für 30 sec an das Template an und wurden im dritten Schritt bei 72 °C für 40 sec durch die Taq-Polymerase (Temperatur unempfindliche Polymerase) zu einem, dem Template entsprechenden Strang, verlängert. Die Wiederholung dieser Dreischritt-Reaktion (30 – 40-fach) führte zur Anreicherung des von den Startermolekülen begrenzten DNA-Bereiches. Zu Beginn dieser Zyklusperiode wurde der Ansatz für 4 min bei 95 °C denaturiert. Nach Beendigung der Zyklen wurde der Taq-Polymerase die Möglichkeit gegeben für 7 min bei 72 °C die unvollständigen DNA-Enden aufzufüllen.

Reaktionsansatz	
10x Taq-Puffer	5,0 µl
DNA	10 ng
dNTP (Stocklsg. 10 mM, bei -20 °C)	2,0 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	2,0 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	2,0 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
dest. H ₂ O	ad. 25 µl

Die PCR-Reaktion wurde dann auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA nach Bedarf weiterverarbeitet. Die für die verschiedenen Reaktionen eingesetzten Primer sind im Kapitel „Material, Oligonukleotide“ aufgeführt.

Techniken zur Analyse von Mausembryonen

Präparation von Mausembryonen

Die für in situ Hybridisierungen oder RNA Isolierungen verwendeten Embryonen wurden aus zeitlich überwachten Verpaarungen von wildtypischen oder mutierten Mausstämmen erhalten. Dabei wurden 12 Uhr am Mittag des Tages des ersten Auftretens eines Vaginalpfropfens dem embryonalen Stadium 0,5 (*post coitum, p. c.*) zugeordnet. Jeder folgende Entwicklungstag wurde addiert. Für die Analysen wurden Embryonen der Stadien Tag 9,5-11,5 *p. c.* verwendet. Die Weibchen wurden dann entsprechend ihrem Alter mittels CO₂ Inkubation getötet und die Uterushörner entnommen. Die Embryonen wurden anschließend in eiskaltem 1x PBS aus den Uteri frei präpariert und in frisches eiskaltes 1x PBS überführt. Embryonen die für RNA Isolierung verwendet wurden, wurden dann in separate Gefäße überführt. Die gesamte Flüssigkeit wurde entfernt, die Embryonen gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Wenn die Embryonen für Ganzkörper in situ Hybridisierung verwendet wurden, wurden sie entweder entsprechend ihres Alters und Phänotyps gesammelt oder ebenfalls getrennt in einzelnen Gefäßen aufbewahrt. Diese Embryonen wurden dann in einer 4 % PFA/PBS-Lösung über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen auf Eis durch 25 %, 50 % und 75 % Methanol/PBS für jeweils 10 min dehydriert und in 14 % H₂O₂/Methanol für 1 h auf Eis gebleicht. Die Embryonen wurden zwei Mal mit einem großen Volumen von 100 % Methanol für 10 min auf Eis gewaschen und bei -20 °C gelagert.

Genotypisierung

Die Identifizierung von *DIII*-Mutanten erfolgte mittels Allel-spezifischer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von DNA aus Mausschwänzen. Dazu wurden den 3 Wochen alten Nachkommen ca. 4 mm der Schwanzspitze abgeschnitten. Für die Genotypisierung von Embryonen wurde ein Teil der cDNA für eine Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Der Verdau mit Proteinase K erfolgte in 300 µl (Schwanzspitzen) Schanz-Puffer, welcher 20 µg/ml Proteinase K enthielt. PCR-Reaktion (siehe PCR-Reaktion, oben)

Die Banden-Größe der PCR-Fragmente ist abhängig von der Verwendung der Template-DNA und der Auswahl von Primern:

genomische DNA	DeltaT-wt-3'	DeltaT-ko-3'	Melta39	DeltaT-wt-gen
DeltaT-wt-5'	821 bp	436 bp	799 bp	522 bp
DeltaT-ko-5'	682 bp	297 bp	660 bp	383 bp
Melta38	500 bp	115 bp	478 bp	201 bp
cDNA	DeltaT-wt-3'	DeltaT-ko-3'	Melta39	DeltaT-wt-gen
DeltaT-wt-5'	594 bp	436 bp	572 bp	-
DeltaT-ko-5'	455 bp	297 bp	433 bp	-
Melta38	273 bp	115 bp	251 bp	-

Ganzkörper-in situ-Hybridisierung

Fixierung und Aufbereitung der Embryonen

Die Embryonen wurden in PBS vorbereitet. Anschließend wurden die Embryonen in 4 % PFA/PBS über Nacht bei 4 °C fixiert, auf Eis mit 25 %, 50 % und 75 % Methanol/PBS (DEPC) für jeweils mindestens 10 min dehydriert, für 1 h mit Methanol/H₂O₂ (6 ml 100 % Methanol + 1 ml H₂O₂) gebleicht, zwei Mal auf Eis mit einem großen Volumen an 100 % Methanol für jeweils 5-10 min dehydriert und in 100 % Methanol bei -20 °C gelagert.

Herstellung der Antisense RNA Probe (Riboprobe)

10 µg der Template DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen linearisiert. QIAquick spin column wurde für die Aufreinigung der DNA verwendet und die DNA in einem Volumen von 30 µl (ca. 330 ng/µl) eluiert. Folgender Reaktionsansatz wurde hergestellt:

- 10 µl DNA
- 3 µl ddH₂O (AmPuWa)
- 2 µl TS-Puffer
- 2 µl rNTPs DigMix
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl RNA-Polymerase (je nach Template-DNA: T7, Sp6, T3)

Dieser Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl DNase hinzu gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. 400 µl 100 % Ethanol, 1 µl tRNA (als Karrier) und 33 µl 7,5 M NH₄Ac wurden dem Reaktionsmix hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 1h bei -80 °C inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 30 min bei 4 °C und 15.000 Upm zentrifugiert; das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und für 15 min bei 4 °C und 15.000 Upm zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde in 100 µl dd H₂O (AmPuWa) aufgenommen und 1 µl RNase-Inhibitor hinzu gegeben. Es wurden 20 µl Aliquots hergestellt und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Kontrolle der Qualität der Riboprobe wurden 3 µl der Antisense RNA auf ein 1 % (normales) Agarosegel zusammen mit tRNA aufgetragen (300 V für 5-10 min).

Hybridisierung

Es wurde frisches 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd in PBT hergestellt. Die Embryonen wurden auf Eis mittels 75 %, 50 % und 25 % Methanol/PBS für jeweils 10 min rehydriert und 2x 10 min mit PBT auf Eis gewaschen. Anschließend wurden sie nochmals 1x 5 min mit PBT auf Eis gewaschen. Für Mausembryonen < 10,5 p. c. (oder Gewebeschnitte) war die Inkubation der Embryonen mit Proteinase K nicht notwendig. Es wurde mit dem RIPA Schritt fortgefahren. Mausembryonen > 10,5 p. c. wurden jedoch mit Proteinase K (10 µg/ml) in Proteinase K Puffer wie folgt behandelt: 10,5 p. c. für 3 min bei 37 °C, 11,5 p. c. für 4 min bei 37 °C und 12,5 p. c. für 5 min bei 37 °C. Die Embryonen wurden dann 2x 5 min mit PBT/Glycin (frisch herstellen) auf Eis und anschließend 2x 5 min mit PBT auf Eis gewaschen. Dann wurden sie für 10 min in RIPA Puffer (ohne schütteln) auf Eis inkubiert und 2x 5 min mit ausreichend PBT auf Eis gewaschen (ohne schütteln) bevor sie für genau 20 min in 4 % PFA/0,2 % Glutaraldehyd in PBT inkubiert wurden. Die Embryonen wurden nach dem Fixierschritt 2x 5 min mit PBT gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) in

Hybridisierungspuffer/PBT (1:2 Mix) inkubiert und im Anschluß mit Hybridisierungspuffer 10min bei RT gewaschen. Die Embryonen wurden dann für die Inkubation mit den einzelnen Proben sortiert. Die Prähybridisierung erfolgte in Hybridisierungspuffer + tRNA (100 µg/ml) bei 68 °C für 3 h. Dann wurde die Probe bei 80 °C für 3 min denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte in einer 1:100 Verdünnung der DIG markierten Probe (0,1 - 1 µg/ml; normalerweise 0,25 µg/ml) + tRNA (100 µg/ml) in Hybridisierungspuffer bei 68 °C über Nacht.

Entfernung der nicht gebundenen Riboprobe

Der Hybridisierungsbuffer und die Lösung SSC/FA/Tween20 wurden auf 65 °C erhitzt. Die Probe wurde dann sorgfältig entfernt (eine Pipette benutzen) und diese bei -20 °C aufbewahrt. Die Embryonen wurden 2x 30 min bei 65 °C mit Hybridisierungspuffer gewaschen und dann auf RT abgekühlt. Dann wurden sie 5min bei RT mit Hybridisierungspuffer/RNase Lösung (1:2 Mix) und 5 min bei RT mit RNase Lösung gewaschen. Anschließend wurden sie 1x 60 min bei 37 °C mit RNase Lösung inkubiert, die 100 µg/ ml RNaseA enthielt. Die Embryonen wurden dann in RNase Lösung/(SSC/FA/Tween20) (1:2 Mix) für 5 min bei RT gewaschen. Die Embryonen wurden in SSC/FA/Tween20 von RT auf 65 °C erwärmt, 2x 5 min bei 65 °C mit SSC/FA/Tween20, 3x 10 min bei 65 °C mit SSC/FA/Tween20 und 5x 30 min bei 65 °C mit SSC/FA/Tween20 gewaschen. Die Embryonen wurden anschließend auf RT abgekühlt, 1x 5 min in (SSC/FA/Tween20)/1x TBST (1:2 Mix) bei RT, 2x 10 min bei RT in 1x TBST und 2x 10 min in MABT gewaschen. Die Embryonen wurden dann für 1h bei RT in 10 % Blockierungslösung/MABT inkubiert. Währenddessen wurde der DIG Antikörper bei 4 °C für 1 h in 1 % Blockierungslösung/MABT (1:5000 Verdünnung) preadsorbiert und die Embryonen im Anschluß in der Antikörperlösung bei 4 °C über Nacht schüttelnd inkubiert.

Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers

Die Embryonen wurden 3x 5 min bei RT mit TBST und ca. 8x 1 h mit TBST bei RT und in TBST über das Wochenende bei 4 °C (schüttelnd) gewaschen.

Färbung

Im Anschluß an die Waschperiode wurde TBST gewechselt und nochmals für 4 h inkubiert. Anschließend wurde 2x 5 min mit Alkaline Phosphatase Puffer (frisch herstellen) bei RT gewaschen. Die Embryonen wurden dann in Färbelösung bei 4 °C gefärbt und die Lösung immer dann gewechselt wenn sie eine leicht pinke Farbe annahm. Die Färbung der Embryonen wurde bei 4 °C über Nacht im Dunkeln entwickelt und die Embryonen wurden während des Färbungsprozesses öfter gewendet. Die Färbung der Embryonen wurde beobachtet und gegebenenfalls bei RT weiter inkubiert. Dann wurden die Embryonen 3x 10 min in Alkalische-Phosphatase-Puffer gewaschen und in 4 % PFA in PBS über Nacht bei 4 °C fixiert (Embryonen können für einige Monate auf diese Weise gelagert werden).

Lösungen

Alle Lösungen, die vor und zur Hybridisierung verwendet wurden, waren absolut RNase frei. DEPC wurde für die Vorbereitung der RNase freien Lösungen verwendet und diese autoklaviert. Die Verwendung von DEPC bei Tris Puffer funktionierte nur, bei zweimaligen autoklavieren.

Herstellung von RNA in situ Proben

Linearisierung

10 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisieren

Reaktionsmix:

10 µg DNA

+10 µl 10x Reaktionspuffer

+5 µl Enzym

mit H₂O auf 100 µl auffüllen

- Ansatz mindestens 2 h bei 37 °C inkubieren
- 2 µl aus dem Reaktionsansatz auf einem 0,8-1 % Agarosegel auf vollständigen Restriktionsverdau analysieren
- + 200 µl H₂O
- +30 µl 3M Natriumacetat
- +660 µl 100 % Ethanol
- mischen und bei 13.000 Upm für 20 min bei 4 °C zentrifugieren, Pellet mit 70 % Ethanol waschen
- Pellet in 50 µl TE resuspendieren

In vitro Transkription

- 5 µl (ca. 1 µg) linearisierte DNA
- 3 µl DIG RNA Markierungsmix
- 3 µl 10x Transkriptionspuffer
- 16 µl H₂O
- 1 µl RNase Inhibitor
- 2 µl RNA Polymerase
- 2 h, 37 °C inkubieren
- 1 µl auf einem denaturierten Gel kontrollieren
- 15 min, 37 °C inkubieren

LiCl Fällung

- 30 µl in vitro Transkriptionsansatz
- 90 µl 1xTE
- 10 µl 4 M LiCl
- 300 µl 100 Ethanol
- mixen
- 30 min bei -20 °C inkubieren
- 20 min bei 13.000 Upm zentrifugieren
- Pellet mit 13.000 Upm zentrifugieren und Pellet lufttrocknen
- Pellet in 100 µl 1x TE resuspendieren

Für die Hybridisierung wurden 10 µl Probe pro ml Hybridisierungspuffer verwendet.

ERGEBNISSE

A Die Analyse des Transkriptoms

Mit Hilfe der Transkriptomanalyse kann annähernd die Gesamtheit der transkribierten RNA eines zu untersuchenden Gewebes beispielsweise eines Organs, Embryos oder Zellen aus einer Zellkultur zu einem bestimmten Zeitpunkt dargestellt werden. Die DNA-Chiptechnologie stellt nur eine Methode der Transkriptomanalyse dar. Weitere Methoden, die kein Bestandteil dieser Arbeit waren, sind beispielsweise die SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (Velculescu et al., 1995) oder die Erstellung von subtraktiven Bibliotheken (Liang and Pardee, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Chip-basierende RNA-Expressionsprofile unter verschiedenen biologischen Fragestellungen verwendet, um die generelle Durchführbarkeit einer solchen Genexpressionsanalyse zu erforschen, neue Zielgene zu identifizieren und molekulare Mechanismen zu untersuchen. Hierbei sollte mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen demonstriert werden, dass die Transkriptomanalyse neue Möglichkeiten zum Studium der Genregulation bietet. Die Untersuchungsmodelle wurden so ausgewählt, dass die Anwendungsmöglichkeiten, aber auch Grenzen der Sensitivität dieser Analysemethode, aufgezeigt werden konnten.

Im ersten Schritt wurde die DNA-Chiptechnologie auf Gewebe angewendet, um den Unterschied in der RNA-Expression zwischen Mausgeweben aus Nullmutanten im Vergleich zu Wildtyp aufzuzeigen. In den nachfolgenden Schritten wurden die Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Geweben immer geringer und damit die Anforderungen an die RNA-Expressionsanalyse immer höher, da prinzipiell eine geringere Anzahl differentiell exprimierter Gene und geringere Expressionsunterschiede zu erwarten waren.

Im Speziellen soll untersucht werden, ob es möglich ist, mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie, signifikante Unterschiede in der Genexpression folgender Systeme festzustellen:

1. In Mausembryonen mit einem inaktivierten Gen.

RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.

2. In Mausgehirnen mit einem gewebespezifisch inaktivierten Gen.

RNA-Expressionsanalysen von Mausgehirnen mit gewebespezifisch ausgeschalteter *Thioredoxinreduktase 1* im Vergleich zu heterozygoten Tieren.

3. In einem Gewebe zweier verschiedener Mausstämmen.

RNA-Expressionsanalyse zur Charakterisierung von Mausstämmen (C3HeB/FeJ und C57BL/6J).

4. In einem Gewebe der Maus, die mit einem Nahrungsergänzungsmittel supplementiert wird.

RNA-Expressionsanalyse zum Studium des Effekts im Mausgehirn nach der Zugabe von Creatin.

Um den Einfluss der „Inneren Uhr“ des Organismus auf die Genexpression zu minimieren, wurden für alle Transkriptomanalysen die zu untersuchenden Mäuse zwischen 9 und 12 Uhr durch die Erhöhung des Kohlendioxid-Partialdruckes und daraus resultierenden Sauerstoffmangels abgetötet. Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme und anschließendem Wiegen sofort eingefroren und bis zur RNA- und Protein-Isolierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt. Vor jeder Analyse wurde die isolierte Gesamt-RNA auf Quantität (Spektralphotometrische Messung zur Konzentrationsbestimmung) und Qualität (denaturierende Agarose-Gelelektrophorese) untersucht.

A.1 DNA-Chiptechnologie

Mit dem Ziel differentiell exprimierte Gene in verschiedenen Geweben zu identifizieren, wurde mit Hilfe von cDNA-Microarrays (Schena et al., 1995) eine RNA-Expressionsprofilanalyse durchgeführt. Bei diesem Verfahren wurde die aus den zu untersuchenden Geweben isolierte RNA, unter Einbau eines Amino-allyl-dUTP's, revers in cDNA umgeschrieben. Die so hergestellte cDNA wurde als so genanntes Target an den freien Aminogruppen mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert und mit dem in unserer Arbeitsgruppe (AG Beckers) hergestellten DNA-Chip (Probe) hybridisiert. Die an Glasträger gekoppelten Microarrays enthalten ein ca. 20.500-Maus-arrayTAG-Klonset von der Firma Lion Bioscience (Drobyshev et al., 2003a). Nach der Hybridisierung, dem Auswaschen der nicht gekoppelten Targets und dem Trocknungsprozess, wurden die DNA-Chips unter Verwendung der Software GenePixPro 3.0 (Axon Instruments) gescannt. Die darauf folgende statistische Analyse wurde mit einem auf LabView-Software gestützten Programm durchgeführt (siehe Ergebnisse A.1.1).

A.1.1 LabView-basierendes Analyseprogramm

Die Analyse der erhaltenen DNA-Chipdaten wurde mittels eines auf LabView-Software basierenden Programms durchgeführt, welches in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde. Ein wesentlicher Vorteil dieses Programms gegenüber diverser anderer kommerziell erhältlicher Software besteht in der Möglichkeit zur simultanen Analyse und Vergleich

mehrerer DNA-Chiphybridisierungen untereinander. Darüber hinaus gewährleistet dieses Programm eine individuelle Anpassung an die im Labor verwendete DNA-Chip-Plattform, beispielsweise für die Verwertung von durch den Scanner erzeugten Rohdaten. Diese Flexibilität gilt vorwiegend im Hinblick auf Erweiterungen des DNA-Chips, als auch in der Verwendung neuer Analyse- bzw. Statistikverfahren. Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Oberfläche des Programms mit seinen Analysemöglichkeiten. Im ersten Schritt werden die aus dem GenePix Pro 3.0 Scanner gewonnenen Rohdaten (GPR-Dateien) geladen. Während dieses Prozesses werden die Rohdaten für jedes einzelne Experiment normalisiert (siehe Material und Methoden, DNA-Chiptechnologie, Normalisierung).

Nun stehen dem Benutzer diverse Einstellungsmöglichkeiten zur Verfügung: Die jeweilige Auswahl ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie der Art der Untersuchung, der Anzahl an durchgeführten und auswertbaren Experimenten, gegeben durch die Qualität der Hybridisierungen, usw. Die Verwendung entsprechender Einstellungen ist unter Beachtung statistischer Grenzeinstellungen individuell für ein Experimente-Set vorzunehmen. Eine unverzichtbare Hilfe hierbei stellen die zusätzlichen Optionen und Informationen, wie die Ansicht des Scatter-Plots (logarithmischer Auftrag der gemessenen Intensität eines jeden detektierten Spots für beide Farbkanäle in einem Koordinatensystem) oder die Bildkontrolle eines jeden Spots, die die Qualität der einzelnen Experimente aufzeigt (Abbildung 6). Weiterhin kann die Korrelation der Experimente untereinander, die gemessene Gesamtzahl an detektierbaren Spotsignalen oder die Spotquantität, für jedes einzelne DNA-Chipexperiment zur Hilfe genommen werden.

Die Analyse stellt den Vergleich von jedem einzelnen Spot in seiner gemessenen Intensität in den beiden Kanälen „grün“ und „rot“ (Wellenlängen 550 nm und 650 nm) in jedem geladenen DNA-Chipexperiment dar. Das Ergebnis wird sowohl tabellarisch als auch grafisch dargestellt, wobei die Reihenfolge der Aufzählung nach dem maximalen Verhältnis der Intensitäten in beiden Kanälen für jeden einzelnen Spot verglichen in allen Experimenten untereinander aufgeführt wird. Der zur Erstellung einer Rangfolge betrachtete Faktor eines jeden Spots ist der Minimalwert unter den ausgewählten Experimenten.

Die entsprechenden Parameter, deren Auswahl Einfluss auf die Aussage über statistische Signifikanz der Ergebnisse hat, werden individuell für jedes experimentelle Set vorgenommen und im Folgenden in den Ergebnisteilen der einzelnen experimentellen Ansätze angegeben.

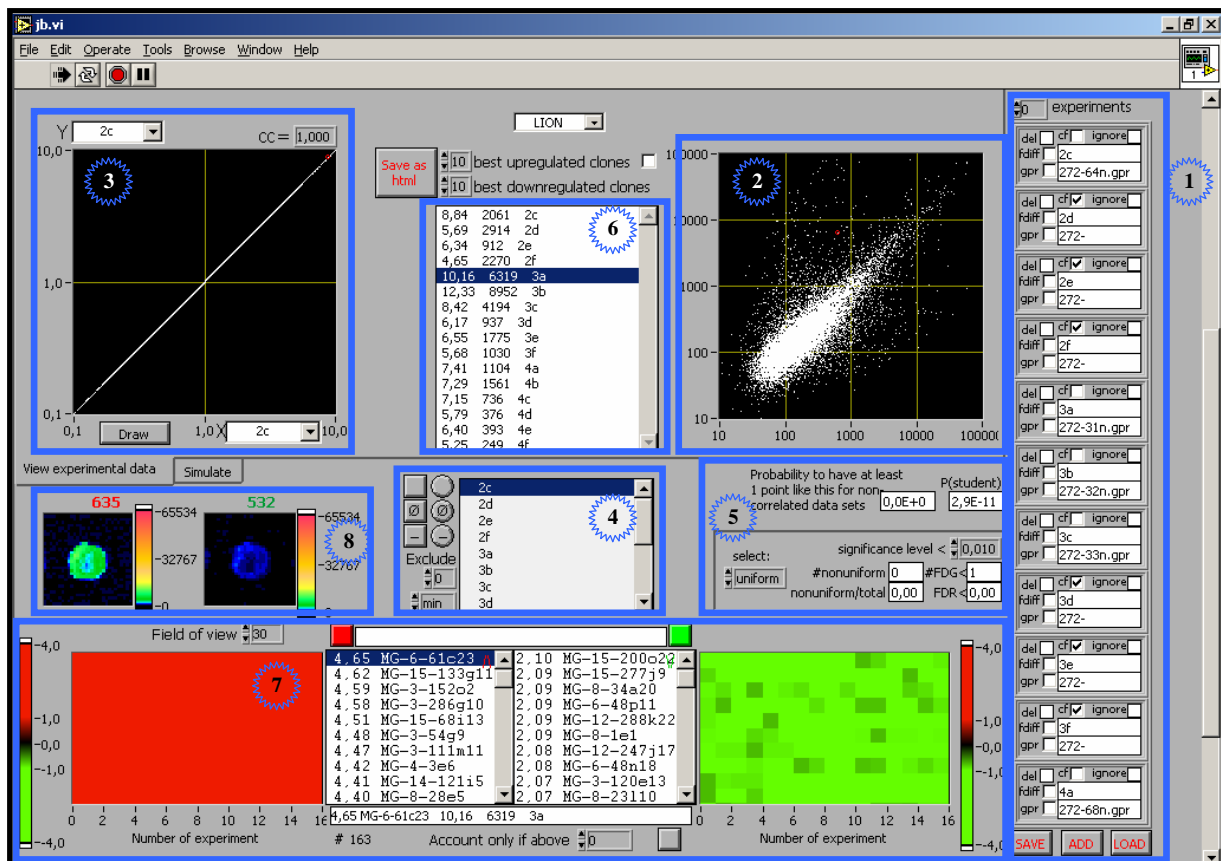


Abbildung 6: Oberfläche des DNA-Chipanalyseprogramms auf Basis von LabView-Software

Übersicht über die Funktionen von Analysesoftware

- 1 Anzeigeleiste zum Hochladen von DNA-Chipdaten (in vorliegendem Fall 16 DNA-Chipexperimente (sichtbar: 10)). Folgende Kontrollkästchen sind in der Leiste für jedes geladene Experiment implementiert: „del“-Löschen, „cf“-markieren einer Farbumkehrhybridisierung, „ignore“-ignorieren in der Analyse, „fdiff“-hochladen von Bilddateien in TIFF-Format, „gpr“-hochladen der Rohdaten. Die Zusammenstellung der hochgeladenen Experimente lässt sich speichern („save“), editieren („add“) oder laden („load“).
- 2 Scatter-Plot: graphische Darstellung jedes Spots in seiner Intensität für beide Kanäle in einem logarithmischen Koordinatensystem
- 3 Korrelationsdiagramm. Jeweils zwei Datensätze aus DNA-Chipexperimenten lassen sich auf eine Korrelation untersuchen (im vorliegenden Fall sind zwei gleiche DNA-Chipdaten geladen, daher korrelieren sie perfekt (Korrelation 1))
- 4 Auswahl bzw. Ausschluss der einzelnen DNA-Chipdatensätze für die Analyse. Außerdem die Möglichkeit der Sortierung dieser DNA-Chips beispielsweise nach Expressionsverhältnissen unabhängig von den Kanälen.
- 5 Einstellung des Signifikanzlevels und die davon abhängige Anzeige der Anzahl an Mustern gleicher und ungleicher Tendenz sowie Angabe des $P_{(\text{Student})}$ -Tests und der Wahrscheinlichkeit für ein zufällig entstandenes Ergebnis eines Spots in einem Experiment
- 6 Tabellarische und graphische Darstellung der Ergebnisse, sortiert nach dem maximalen Verhältnis der Intensitäten für Kanal „rot“ gegen/und Kanal „grün“. Tabellarisch: Angabe des Verhältnisses und die interne Bezeichnung der jeweiligen cDNA. Graphisch: Die Verhältnisse der gemessenen Intensitäten für alle zu vergleichenden Experimente (in diesem Fall 16), dargestellt in Farbkodierung gemäß außen platzierter Farbskala.
- 7 Auflistung des Expressionsverhältnisses und der Intensität der unter 6 markierten cDNA für jedes DNA-Chipexperiment



Sichtkontrolle der Original-DNA-Chips für jedes Experiment und für jeden Spot

A.2 RNA-Expressionsanalyse von Mausembryonen mit inaktiviertem Gen: Die *Dll1*-knock-out-Maus

Um eine vergleichende Transkriptomanalyse am Beispiel eines Gewebes mit ausgeschaltetem Gen im Vergleich zum Wildtyp durchzuführen und neue Zielgene von *Dll1* zu identifizieren, wurde eine RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-Embryonen des Genotyps *Dll1*^{LacZ/LacZ} versus *Dll1*^{+/+} hergestellt. Hierfür wurde aus acht *Dll1*^{LacZ/LacZ}-Mausembryonen im Embryonalstadium von Tag 11,5 nach der Befruchtung (*post coitum*; *p. c.*) die Gesamt-RNA isoliert und nach Quantitäts- und Qualitätsbestimmung in gleichen Mengenteilen miteinander zu einem RNA-Pool vermischt. Ein solcher RNA-Pool wurde ebenfalls aus der Gesamt-RNA von acht wildtypischen Embryonen des gleichen Alters hergestellt. Diese beiden RNA-Pools wurden für die Erstellung von acht RNA-Expressionsprofilen verwendet. Die Verwendung von gleichem biologischen Material (DNA-Pool 1-8) macht die Wiederholungen der DNA-Chiphybridisierungen zu technischen Replikas (Tabelle 1, (a-h)).

Tabelle 1: Zusammenstellung von acht DNA-Chiphybridisierungen von Mausembryonen Tag 11,5 *p. c.* des Genotyps *Dll1*^{LacZ/LacZ} versus *Dll1*^{+/+}.

Embryo-pool	DNA-Chip	Cy3/Cy5- Markierung	Anzahl detektierter Gene	In <i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} -Mausembryonen (hoch-reguliert/runter-reguliert)
1-8	a	<i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} / <i>Dll1</i> ^{+/+}	5.506	
	b	<i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} / <i>Dll1</i> ^{+/+}	3.087	
	c	<i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} / <i>Dll1</i> ^{+/+}	9.539	
	d	<i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} / <i>Dll1</i> ^{+/+}	5.789	
	e	<i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} / <i>Dll1</i> ^{+/+}	10.305	
	f	<i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ} / <i>Dll1</i> ^{+/+}	8.973	
	g	<i>Dll1</i> ^{+/+} / <i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ}	5.524	
	h	<i>Dll1</i> ^{+/+} / <i>Dll1</i> ^{LacZ/LacZ}	7.377	
Zusammen			2.639	172 / 124 (p<0,01)

In einzelnen DNA-Chiphybridisierungen der vergleichenden RNA-Expressionsanalyse konnte für 3.087 bis 10.305 Proben ein detektierbares Signal gefunden werden. In allen acht Wiederholungen der DNA-Chiphybridisierungen einschließlich zweier Farbumkehrexperimente (umgekehrte Farbmarkierung der Targets) wurden 2.639 Proben mit Signalen auf allen DNA-Chips detektiert (Tabelle 1).

Diese gemeinsamen Signalintensitäten wurden unter Verwendung von stringenten, statistischen Kriterien mit der LabView-Software (siehe Ergebnisse A.1) hinsichtlich ihrer Signifikanz untersucht. Basierend auf Erwartungen von statistischen Standardnormalverteilungen von Proben und Expressionsverhältnissen würde die Auswahl

von 296 differentiell exprimierten Genen mindestens ein falsch-positives Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ beinhalten (Tabelle 1). Von diesen 296 differentiell exprimierten Genen sind 172 hoch-reguliert und 124 runter-reguliert in der *DIII*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp.

Basierend auf dem niedrigsten absoluten Verhältnis der Signalintensität aus allen acht DNA-Chiphybridisierungsexperimenten, ungeachtet der Reproduzierbarkeit, wurden die detektierten Gene in ihrer Rangfolge aufgelistet (Tabelle 2). In dieser Auflistung wurden in den 100 am stärksten differentiell regulierten Genen 4 nichtreproduzierbar differentiell exprimierte Gene in allen acht DNA-Chiphybridisierungen gefunden (Tabelle 2). Unter diesen 100 differentiell exprimierten Genen befinden sich alle oberhalb des Expressionsverhältnisses von 1,89 (Minimum der absoluten Expressionsverhältnisse in allen acht DNA-Chiphybridisierungen). Laut statistischer Berechnungen enthielt diese Auswahl mindestens zwei nicht-differentiell exprimierte (NDE) Gene mit einem Signifikanzlevel von $p < 0,01$. Die Zahlen für nicht-reproduzierbare Gene und erwartete NDE (falsch positive) Gene für $p < 0,01$ sind für verschiedene Auswahlen in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Expressionsmusteranalyse von RNA-Expressionsdaten von Mausembryonen Tag 11,5 p. c. des Genotyps *DIII^{LacZ/LacZ}* versus *DIII^{+/+}*.

Expressionsmusteranalyse von RNA-Expressionsdaten			
Anzahl der Gene	Anzahl der nichtreproduzierbaren Gene	NDE $p < 0,01$	Bandweite der Expressionsverhältnisse (Minimum in 8 Experimenten)
1 - 10	0	≥ 1	24,19 – 8,15
1 - 20	0	≥ 1	24,19 – 7,06
1 - 50	0	≥ 1	24,19 – 4,12
1 - 100	4	≥ 2	24,19 – 1,89
1 - 200	11	≥ 2	24,19 – 1,45

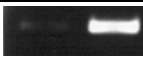
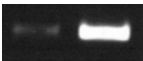


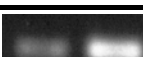

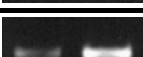
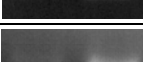



Die Auswahl der 63 am stärksten differentiell exprimierten Gene enthielt keine nicht-reproduzierbaren Genexpressionen. Diese 63 signifikant regulierten Gene (32 hoch-reguliert, 31 runter-reguliert in der *DIII*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp) wurden als Kandidatengene definiert und für weitere Verifikationsanalysen verwendet (Anhang, Tabelle 12).

A.2.1 Verifizierung der RNA-Expressionsdaten mit Hilfe der RT-PCR

Um die Expression der in der DNA-Chipanalyse differentiell exprimierten Gene zu validieren, wurde eine Reverse-Transkription-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) durchgeführt, mit deren Hilfe die amplifizierten DNA-Fragmente nach dem Sichtbarmachen auf einem Agarosegel eine Abschätzung der Verhältnisse der eingesetzten cDNA in der definierten Menge an Gesamt-cDNA erlauben sollen. Über den Vergleich der cDNA-Menge in *DIII*-Mutanten (*DIII*^{LacZ/LacZ}) zum Wildtypen (*DIII*^{+/+}) lassen sich die aus der DNA-Chipanalyse erhaltenen Genexpressionsverhältnisse überprüfen. Für diese Verifizierung wurden von fünf zufällig ausgewählten Kandidatengenen, die in der DNA-Chipanalyse hoch-reguliert waren, jeweils zwei unabhängige Oligonukleotidpaare als PCR-Primer (Primerpaar a und b) generiert. Die Verwendung von zwei unabhängigen Primerpaaren (aus möglichst zwei verschiedenen Sequenzbereichen), die in zwei unabhängigen PCR-Reaktionen verwendet wurden, erhöht die Signifikanz dieser Verifizierung. Zur Kontrolle wurde ebenfalls ein Primerpaar eines Haushaltsgens *GAPDH* verwendet, von dem bekannt ist, dass es sowohl in Mutanten- als auch in Wildtypengewebe in gleichen Mengen exprimiert wird. Die RT-PCR-Analyse bestätigte, dass das Gen *GAPDH* sowohl in der *DIII*-Mutante als auch im Wildtyp in gleicher Menge als Transkript vorkommt (Tabelle 3).

Dagegen konnte für alle 5 zufällig ausgewählten Kandidatengene, die in der DNA-Chipanalyse in *DIII*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp hoch-reguliert waren, die differentielle Expression auch in den RT-PCR-Experimenten bestätigt werden (Tabelle 3). Es fällt jedoch auf, dass die abgeschätzten Expressionsverhältnisse sich zwischen den Primerpaaren a und b teilweise stark unterscheiden. Beispielsweise für den Riken-Klon *2310056P07Rik* zeigt das RT-PCR-Experiment bei Verwendung von Primerpaar b eine verhältnismäßig hohe Überexpression (vielfach) in der *DIII*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp, während für das Primerpaar a ein schwacher Expressionsunterschied (sicherlich unterhalb zweifach) abzuschätzen ist (Tabelle 3).

Tabelle 3: RT-PCR 5 zufällig ausgewählter, in DNA-Chipanalysen hoch-regulierter, Gene von Embryonen Tag 11,5 p. c. des Genotyps *Dll1^{LacZ/LacZ}* versus *Dll1^{+/+}*. Expr.-Verhältnis (DNA-Chips): Expressionsverhältnisse erhalten aus DNA-Chipanalysen (rot=hoch-reguliert in *Dll1*-Mutante); angegeben das niedrigste und höchste Expressionsverhältnis; Primer: jeweils zwei Primerpaare wurden für eine cDNA ausgewählt; RT-PCR (*Dll1^{+/+}* - *Dll1^{LacZ/LacZ}*): Fotografien von Banden der amplifizierten cDNA-Fragmente, aufgetrennt nach 1%-Agarose-Gelelektrophorese. Die RT-PCR-Analyse unter Verwendung von Primern eines Haushaltgens, *GAPDH*, liefert die Kontrolle für gleiche Expressionsverhältnisse in *Dll1*-Mutante und Wildtyp.

Gen-Symbol	Expr.-Verhältnis (DNA-Chips)	Primerpaar	RT-PCR <i>Dll1^{+/+}</i> - <i>Dll1^{LacZ/LacZ}</i>
Ndrgl	24,19-41,11	Primerpaar a	
		Primerpaar b	
P4ha1	7,20-13,69	Primerpaar a	
		Primerpaar b	
D530020C15Rik	6,70-13,03	Primerpaar a	
		Primerpaar b	
Hig1	4,20-7,62	Primerpaar a	
		Primerpaar b	
2310056P07Rik	3,83-9,35	Primerpaar a	
		Primerpaar b	
GAPDH	nicht auf dem DNA-Chip	Primerpaar	

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die RT-PCR-Analyse lediglich eine Tendenz in den Genexpressionen zwischen untersuchten Geweben aufzeigen kann und keine Aussagen über die absoluten Quantitätsunterschiede der eingesetzten cDNAs erkennt, also insgesamt nur eine unzureichende Verifizierung der DNA-Chipdaten liefert. Darüber hinaus lassen sich geringe differentielle Expressionsunterschiede nicht immer eindeutig identifizieren. Die Verwendung von zwei unabhängigen Primerpaaren unterstützt die Aussagekraft dieser Analyse zwar, zeigt aber in stark abweichenden Ergebnissen ihre Ungenauigkeit.

A.2.2 Verifizierung der RNA-Expressionsdaten mit Hilfe der Echtzeit-PCR

Zur genauen Quantifizierung der RNA-Expressionslevels zwischen der *Dll1*-Mutante und dem Wildtyp und der Bewertung der DNA-Chipdaten wurde für die 27 am stärksten differentiell exprimierten Gene (18 hoch-reguliert und 9 runter-reguliert in der *Dll1*-Mutante)

eine Echtzeit-PCR (*RealTime*-PCR) unter Verwendung der TaqMan-Apparatur (ABI Prism) durchgeführt.

Die Echtzeit-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Analyse relativer und absoluter Quantitäten von RNA. Das Prinzip basiert auf der Verwendung eines „SYBR® Green“-Farbstoffes, welcher die Eigenschaft besitzt, sich in die „kleine Furche“ der doppelsträngigen cDNA einzulagern, die zuvor aus einer RNA gebildet wurde. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Die Signalintensitäten können während der PCR kontinuierlich gemessen werden, so dass die absoluten Quantitäten der amplifizierten cDNAs in jedem PCR-Zyklus bestimmt werden können und so einen Rückschluss auf die Zahl der Ausgangskopien im PCR-Ansatz von Test- und Referenzproben erlauben. Daraus lassen sich wiederum die relativen Verhältnisse der Ausgangskopien bestimmen z. B. zwischen Mutante- und Wildtyp-cDNA und mit den Genexpressionsverhältnissen aus der DNA-Chipanalyse vergleichen.

Als Ausgangsmaterial für eine reverse Transkription wurde die gleiche RNA verwendet, die auch für die DNA-Chipanalyse eingesetzt wurde. Nach Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung wurde die Konzentration der *DIII*-Mutante und der Wildtyp-cDNAs auf 10 ng/µl eingestellt. Zur Verstärkung der Signifikanz der Aussage wurden je Gen zwei, aus möglichst unterschiedlichen Gensequenzregionen stammende Primerpaare (a und b) ausgewählt, die eine durchschnittliche PCR-Produktlänge zwischen 150 und 400 bp ergeben. Die Auswahl dieser Primer erfolgte unter Verwendung der im Internet verfügbaren Software, Primer3 (*Whitehead Institute for Biomedical Research*) und der Software VectorNTI (Informax).

Für jede Analyse wurden so genannte *triplets* erstellt. D. h. für jedes Gen wurde in einem Ansatz dreimal eine Echtzeit-PCR-Reaktion durchgeführt und die erhaltenen Quantitäten gemittelt. Für die 27 am stärksten differentiell exprimierten Gene wurden die relativen Verhältnisse der cDNAs, die mit zwei Primerpaaren in zwei unabhängigen Reaktionen erhalten wurden (Echtzeit-PCR), mit den minimalen RNA-Expressionsverhältnissen in 8 DNA-Chips verglichen (Abbildung 7 und Abbildung 8). Für alle zufällig ausgewählten Gene, die aus der DNA-Chipanalyse hervorgegangen sind, konnte die differentielle Expression in Echtzeit-PCR verifiziert werden.

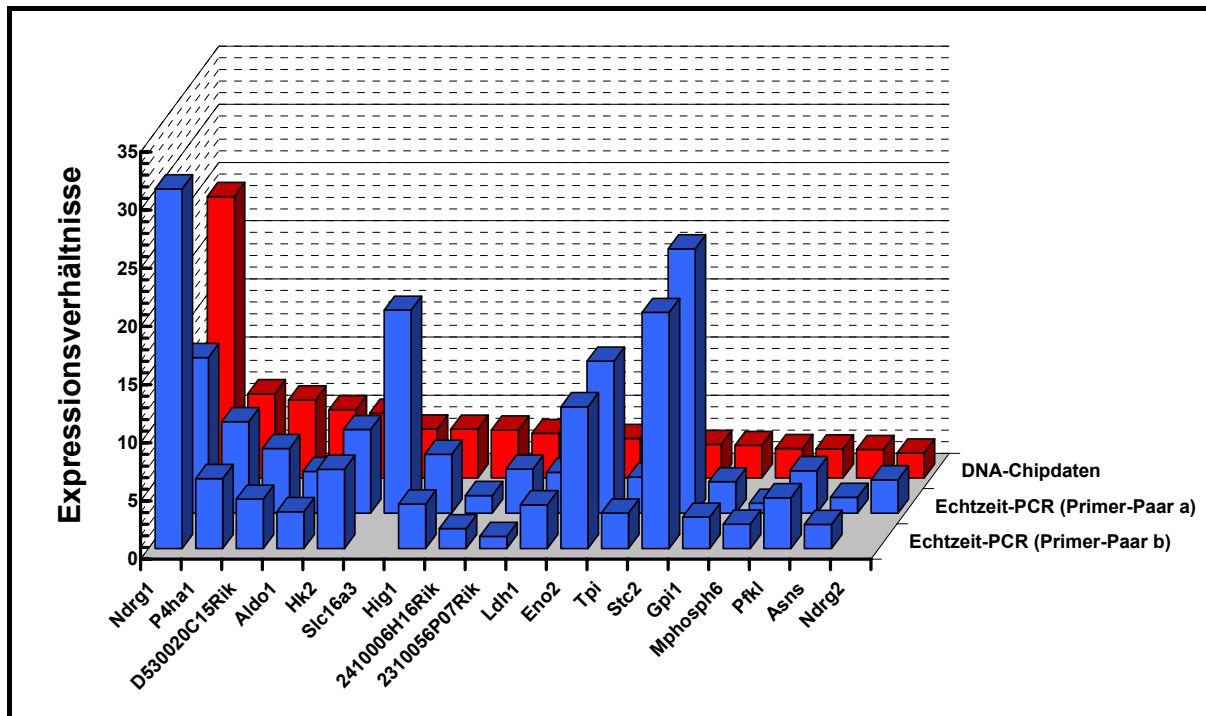


Abbildung 7: Vergleich der Expressionsverhältnisse aus Echtzeit-PCR (TaqMan) und DNA-Chipdaten für 18 am stärksten in DNA-Chipexperimenten hoch-regulierte Gene in Embryonen des Genotyps *Dll1^{LacZ/LacZ}* im Vergleich zum Wildtyp (*Dll1^{+/+}*). Echtzeit-PCR: zwei Primerpaare (a und b) in zwei unabhängigen Reaktionen; DNA-Chipdaten: minimale RNA-Expressionsverhältnisse in 8 DNA-Chips. Felder ohne Angabe weisen auf „kein Resultat“ in der Echtzeit-PCR.

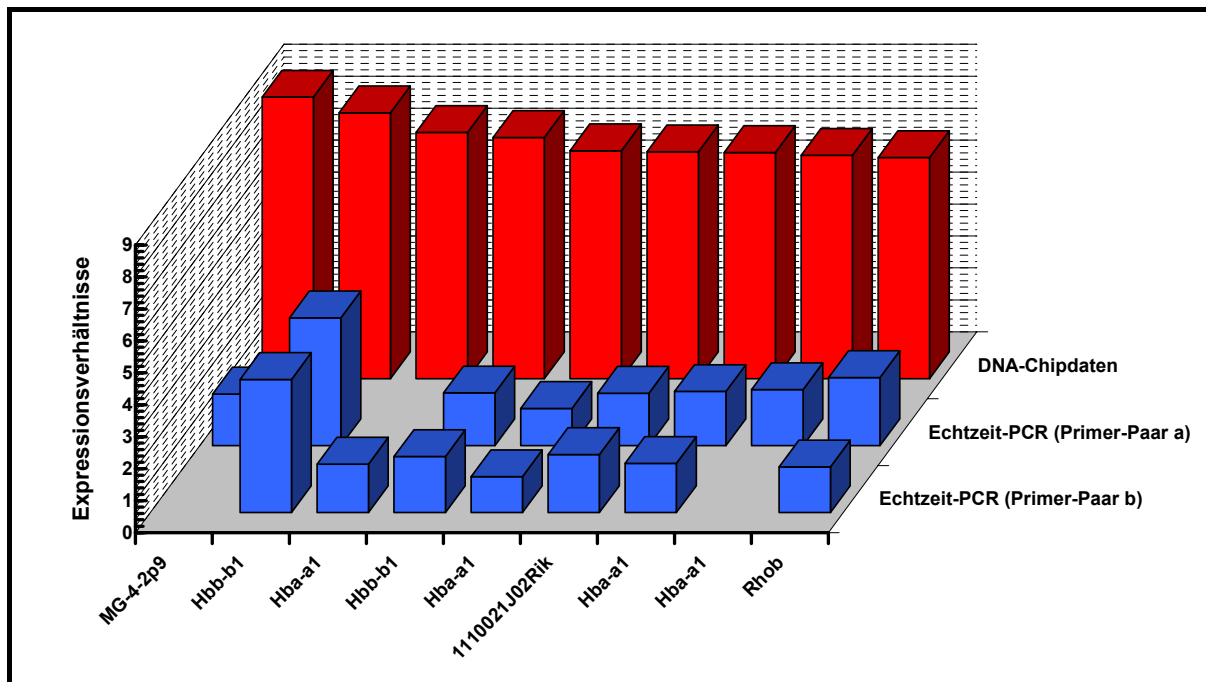


Abbildung 8: Vergleich der Expressionsverhältnisse aus Echtzeit-PCR (TaqMan) und DNA-Chipdaten für 9 am stärksten in DNA-Chipexperimenten runter-regulierte Gene in Embryonen des Genotyps *Dll1^{LacZ/LacZ}* im Vergleich zum Wildtyp (*Dll1^{+/+}*). Echtzeit-PCR: zwei Primerpaare (a und b) in zwei unabhängigen Reaktionen; DNA-Chipdaten: minimale RNA-Expressionsverhältnisse in 8 DNA-Chips. Felder ohne Angabe weisen auf „kein Resultat“ in der Echtzeit-PCR.

Um die Echtzeit-PCR-Analyse zu unterstützen und noch zusätzlich mit einem zweiten Verfahren der Echtzeit-PCR zu vergleichen, wurde für sieben zufällig ausgewählte, in der DNA-Chipanalyse hoch-regulierte Gene eine Echtzeit-PCR mit der LightCycler-Apparatur (Roche) eingesetzt (Tabelle 4). Die Verwendung zweier verschiedener Apparaturen hat, außer der höheren Signifikanz der Verifizierung, den Vorteil die beiden Apparaturen miteinander vergleichen zu können (Tabelle 4).

Alle zuvor mit Hilfe der Echtzeit-PCR-Verfahren von TaqMan verifizierten Genexpressionsverhältnisse aus der DNA-Chipanalyse konnten auch mit Hilfe der LightCycler-Apparatur in der Tendenz bestätigt werden. Beispielsweise das aus den DNA-Chipdaten als das am stärksten differentiell exprimierte Gen, *Ndrgr1* (hoch-reguliert in 8 DNA-Chips: 24- bis 41-fach in der *DIII*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp), zeigt sowohl in der TaqMan-PCR (13,4-fach (Primer a), 30,9-fach (Primer b)) als auch in der LightCycler-PCR (8,8-fach (Primer a), 6,3-fach (Primer b)) in der *DIII*-Mutante eine höhere Expression als in Wildtyp (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der RNA-Expressionsdaten aus DNA-Chipanalyse und Echtzeit-PCR für sieben zufällig ausgewählte, am stärksten in der *DIII*-Mutante hoch-regulierte Gene. „Rot“: hoch-reguliert in der *DIII*-Mutante, „Expr.-Verhältnis“: Genexpressionsverhältnisse

Gen-Symbol	Expr.-Verhältnis (in 8 DNA-Chips)	Expr.-Verhältnis (TaqMan)		Expr.-Verhältnis (LightCycler)	
		Primerpaar a	Primerpaar b	Primerpaar a	Primerpaar a
Ndrgr1	24,19-41,11	13,38	30,92	8,84	6,32
P4ha1	7,20-13,69	7,87	6,01	4,15	3,16
D530020C15Rik	6,70-13,03	5,56	4,24	5,35	4,55
Aldo1	5,87-12,55	3,60	3,16	2,51	3,80
Hig1	4,20-7,62	5,06	3,83	2,97	2,72
2310056P07Rik	3,83-9,35	3,79	1,04	3,2	3,05
Tpi	3,37-6,55	3,09	3,05	1,93	2,61

Schon beim allgemeinen Betrachten der RNA-Expressionsverhältnisse wird deutlich, dass trotz der Übereinstimmung der Tendenz sich die Beträge der Expressionsverhältnisse deutlich in den verwendeten Analysen unterscheiden. Die Bildung der Mittelwerte und der Standardabweichungen aus Daten von 8 DNA-Chipanalysen und je 2 Echtzeit-PCRs (Verwendung zweier unterschiedlicher Primerpaare) ermöglicht eine genauere Betrachtung der Unterschiede. Das in der DNA-Chipanalyse am stärksten differentiell exprimierte Gen *Ndrgr1* ist 32,65±12,0-fach in der *DIII*-Mutante hoch-reguliert, während die Echtzeit-PCRs eine differentielle Expression von 22,15±12,4 (TaqMan) und 7,58±1,78 (LightCycler)

aufweisen (Abbildung 9). Auffällig ist dabei, dass selbst die Ergebnisse aus der gleichen Analysemethode (Echtzeit-PCR) nur mit unterschiedlichen Apparaturen teilweise stark in den Ergebnissen von einander differieren. Die Standardabweichungen der Resultate aus der Analyse mit LightCycler sind für 5 von 7 analysierten Genen geringer als die von der Analyse mit TaqMan-Apparatur (Abbildung 9).

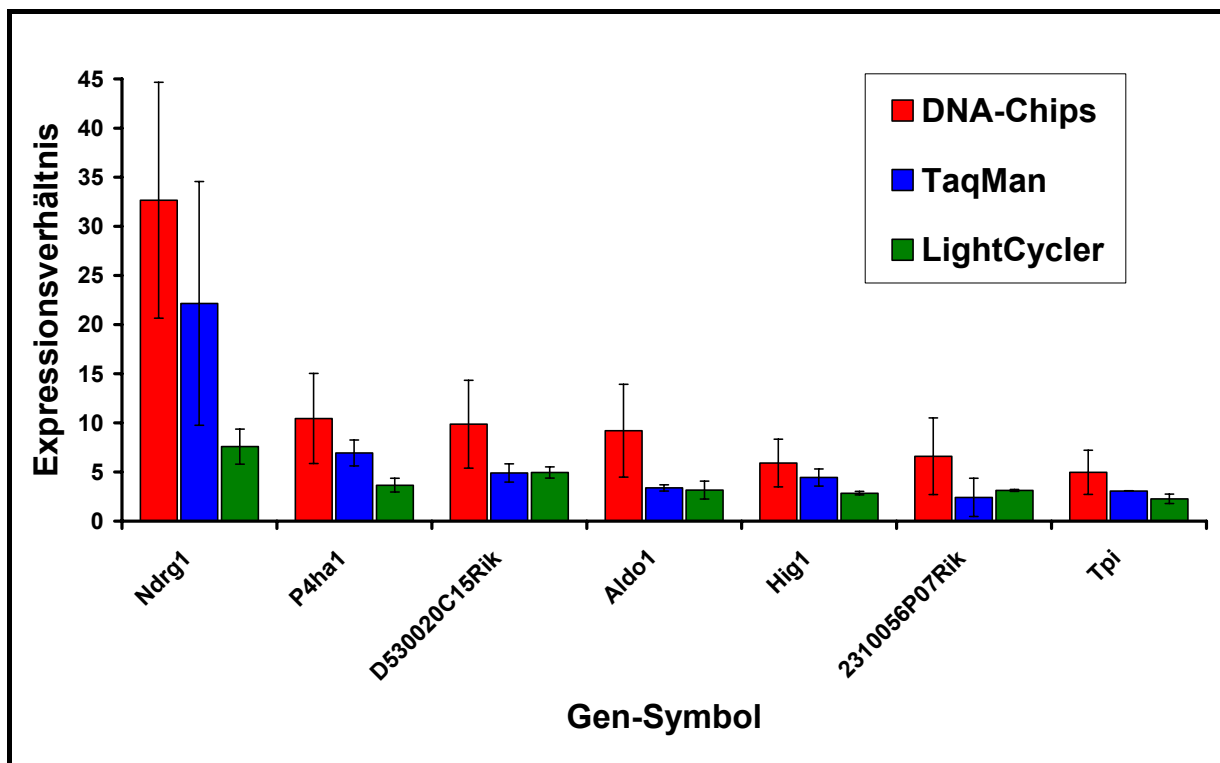


Abbildung 9: Vergleich der Abweichung der RNA-Expressionsdaten aus DNA-Chipanalyse und Echtzeit-PCR für die am stärksten in der *DIII*-Mutante hoch-regulierten Gene aus der DNA-Chipanalyse.

Zusammenfassend konnten alle 27 zufällig ausgewählte Gene (die in der DNA-Chipanalyse am stärksten differentiell exprimiert waren) mit Hilfe der RT-PCR und der Echtzeit-PCR verifiziert werden. Das Ergebnis spricht für die Zuverlässigkeit der DNA-Chipdaten. Allerdings konnte aufgezeigt werden, dass die verwendeten Methoden Unterschiede in den Beträgen der Expressionsverhältnisse zeigen. Außerdem war auffällig, dass die mit dem LightCycler durchgeführten Echtzeit-PCR-Reaktionen mit zwei Primern ähnliche Ergebnisse liefern, da die Standardabweichungen dieser Messwerte im Vergleich zu TaqMan geringer waren.

A.2.3 *Expression von differentiell regulierten Transkripten an Ganzkörper-in situ-Hybridisierungen*

Während der Embryonalentwicklung wird das *Dlll*-Gen nach einem komplexen und dynamischen Muster in definierten Regionen exprimiert (Beckers et al., 1999; Bettenhausen et al., 1995; Morrison et al., 1999). Die Expression von *Dlll* kann erstmals am Tag 7 nach der Befruchtung (*post coitum*; *p. c.*) im Primitivstreifen und im embryonalen Mesoderm beobachtet werden, während sie am Tag 7,5 *p. c.* auf das posteriore Mesoderm begrenzt ist. Während der präsomitischen Entwicklung zeigt sich eine scharfe Grenze der Expression unmittelbar anterior des Primitivknotens. Die starke *Dlll*-Expression im präsomitischen Mesoderm bleibt bis zum Ende der Somitogenese zwischen Tag 14 - 15 *p. c.* erhalten. Ab Tag 8 der Embryonalentwicklung ist *Dlll* außerdem im zentralen Nervensystem in den anterioren Neuralfalten des späteren Mittel- und Vorderhirns exprimiert. Ab Tag 9 *p. c.* dehnt sich die Expression von *Dlll* auf das Neuralrohr aus und ist später auch in den Neuralleistenzellen, in den Spinalganglien sowie in den Spinalnerven zu erkennen.

Um die Ergebnisse der differentiell exprimierten Gene aus der DNA-Chipanalyse im Mausgewebe zu bestätigen und deren Expressionsmuster zu untersuchen, wurden Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an wildtypischen Mausembryonen des Embryonalalters Tag 11,5 durchgeführt. Um anschließend potentielle Verbindungen zwischen diesen Genen und der Expression von *Dlll* feststellen zu können, wurde deren Expressionsmuster mit der murinen Expression von *Dlll* verglichen und mögliche überlappende Expressionsbereiche identifiziert.

Für diese Expressionsstudie wurden aus den zuvor verifizierten, in den *Dlll*-*knock-out*-Mausembryonen hoch-regulierten Genen (DNA-Chipanalyse), 15 Gene zufällig ausgewählt und an gleichaltrigen, Tag 11,5 *p. c.*, wildtypischen Mausembryonen durchgeführt (Abbildung 10). Für die Herstellung von markierten *antisense*-mRNA-Proben wurden die gleichen cDNAs verwendet, die für die Erstellung von DNA-Chips eingesetzt worden waren. Somit enthielten diese Proben in den Sequenzen keine Genfamilienspezifischen homologen Bereiche, keine repetitiven Regionen und keine Poly(A)-Schwänze. Die ausgewählten Sequenzbereiche lagen vorwiegend in den 3' untranslatierten Regionen (3'UTRs) und variierten in ihrer Länge zwischen ca. 500 und ca. 800 bp. Die Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen wurden nach einem modifizierten Verfahren von Wilkinson et al., 1992 durchgeführt (siehe Material und Methoden, Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierung).

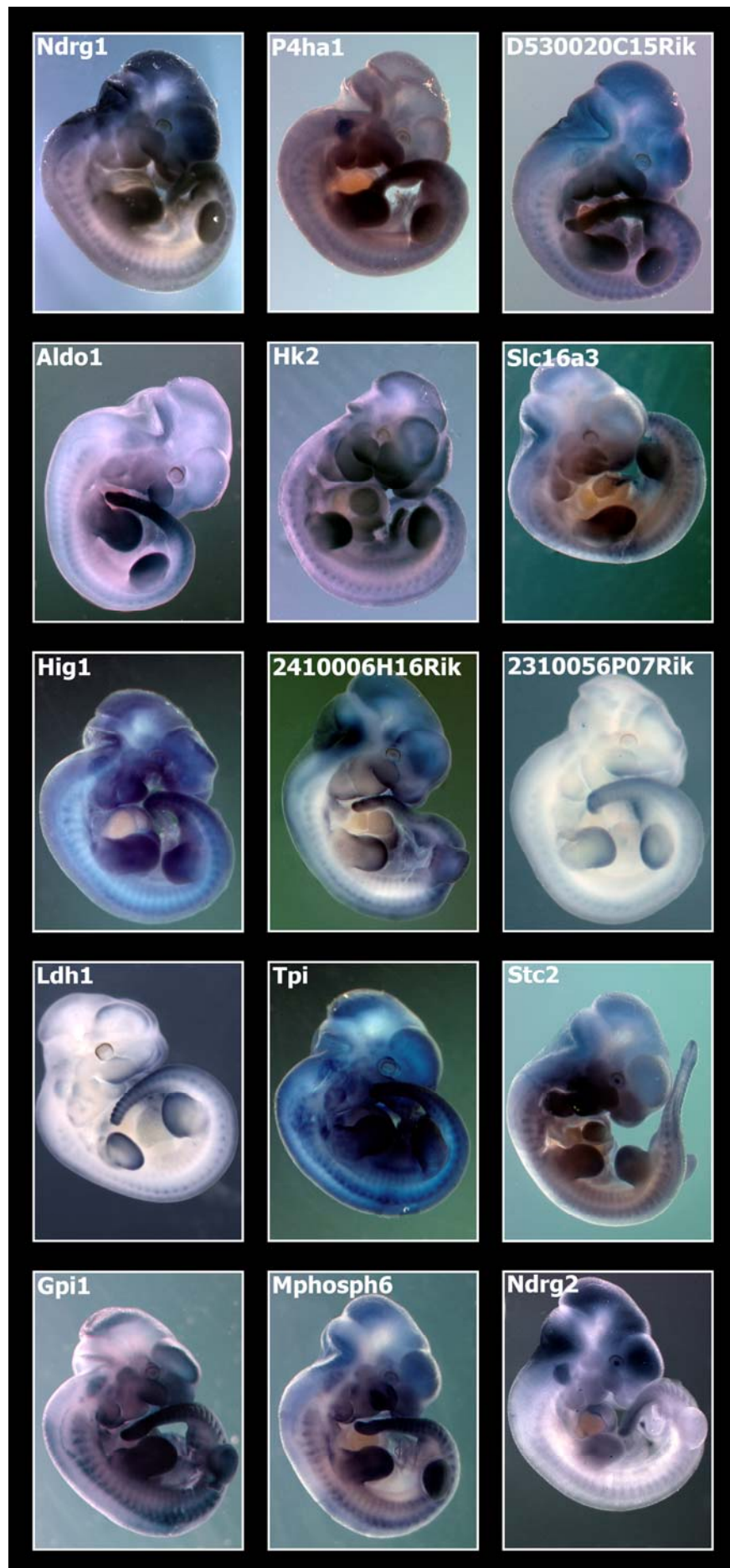


Abbildung 10: Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen von 15 zufällig ausgewählten Genen, die in *Dll1*-knock-out-Mausembryonen hoch-reguliert waren (DNA-Chipanalyse) an wildtypischen Mausembryonen des Embryonalalters Tag 11,5 *p. c.* Alle Kandidatengene wurden an Tag 11,5 *p. c.* in der Maus exprimiert. Alle Kandidatengene zeigten Expressionen im präsomitischen Mesoderm (PMS) (*Stc2* schwach), die meisten in Somitenkompartimenten (außer *Ndr2*, *2310056P07Rik*) und einige in Gehirnesikeln (außer *Ldh1*, *Aldo1*, *2310056P07Rik*, *Slc16A3*, *P4ha1*). Darüber hinaus konnten auch zusätzliche Expressionsbereiche festgestellt werden, wie z. B. in den Gliedmaßen, in denen alle Kandidatengene exprimiert wurden.

An Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen in wildtypischen Embryonen konnte zunächst gezeigt werden, dass alle ausgewählten, differentiell exprimierten Gene aus der DNA-Chipanalyse auch in gleichaltrigen wildtypischen Embryonen exprimiert wurden. Das bedeutet, dass zum gewählten Analysezeitpunkt die mRNA der einzelnen Kandidatengene auch tatsächlich in den Mausembryonen vorhanden war, was bereits die Ergebnisse der RT-PCR und der Echtzeit-PCR bestätigten. Kontrollexperimente unter Verwendung von *sense*-Riboproben in Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen zeigten entweder keine oder nur eine Hintergrundfärbung.

Anschließend wurde die Expression der Kandidatengene mit der von *Dll1* in Embryonen verglichen. Am Tag 11,5 *p. c.* ist *Dll1* unter anderem im präsomitischen Mesoderm (PSM), in der Schwanzspitze, in Gehirnesikeln und im Rückenmark exprimiert (Bettenhausen et al., 1995). Alle Kandidatengene zeigten zu diesem Analysezeitpunkt ein zumindest teilweise mit *Dll1* überlappendes Expressionsmuster im präsomitischen Mesoderm (*Stc2* schwach), die meisten in Somitenkompartimenten (außer *Ndr2* und *2310056P07Rik*) und einige in Gehirnesikeln (außer *Ldh1*, *Aldo1*, *2310056P07Rik*, *Slc16A3*, *P4ha1*). Darüber hinaus konnten auch zusätzliche Expressionsbereiche festgestellt werden, wie z. B. in den Gliedmaßen, in denen alle Kandidatengene exprimiert waren (Abbildung 10).

Um festzustellen, wie die Expressionsmuster der hoch-regulierten Kandidatengene in *Dll1*-knock-out homozygoten Mausembryonen aussehen, wären folglich Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an solchen Embryonen durchzuführen. Allerdings sind *Dll1*-defiziente Mäuse ab dem Alter von 12,5 *p. c.* wie oben beschrieben letal. Zum Untersuchungszeitpunkt von Tag 11,5 *p. c.* sind diese Embryonen teilweise morphologisch verändert und deshalb bringen Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen nicht den gewünschten Erfolg. Die Embryonen sind undurchsichtig oder zum Teil resorbiert.

Die Untersuchung der in den DNA-Chipanalysen runter-regulierten Gene wurde nicht durchgeführt.

A.3 RNA-Expressionsanalyse von Mausgehirnen mit gewebespezifisch inaktiviertem Gen: Die Thioredoxinreduktase 1-knock-out-Maus

Es ist bekannt, dass das in einer Vielzahl von biochemischen Prozessen involvierte und bedeutende Thioredoxin-Redox-System die intrazelluläre Redox-Umgebung reguliert (Holmgren, 1985). Es zeigte sich, dass Mäuse mit einem gewebespezifischen, auf neuronale Vorläuferzellen beschränkten, konditionalen *Txnrd1-kock out* Ataxie und cerebellare Hypoplasie aufwiesen (Jakupoglu et al., 2005). Für eine vergleichende Transkriptomanalyse wurden RNA-Expressionsprofile von gehirnspezifischen *Txnrd1*-defizienten Mäusen im Alter von 14 Tagen nach der Geburt (*post partum; p. p.*) verwendet (Zusammenarbeit mit Dr. Cemile Jakupoglu). Dieser Analysezeitpunkt liegt zwischen dem ersten Auftreten von morphologischen Veränderungen im Alter von 7 Tagen *p. p.* und dem Mausalter von 3 Wochen, in dem das Cerebellum normalerweise vollständig entwickelt ist. Insgesamt wurden für eine vergleichende Transkriptomanalyse 10 RNA-Expressionsprofile von ganzen Gehirnen erstellt, wobei 5 RNA-Proben aus *Txnrd1*-Mausmutanten (*Txnrd1^{flox/flox(Tg-Nes-Cre)}*) jeweils mit dem RNA-Pool aus 5 Kontrolltieren (*Txnrd1^{wt/flox(Tg-Nes-Cre)}*) verglichen wurden (beinhaltend jeweils eine Farbumkehrwiederholung; Tabelle 5; a und b).

Tabelle 5: Zusammenstellung von 10 DNA-Chipphybridisierungen mit Gehirnen aus 14 Tage alten Mäusen des Genotyps *Txnrd1^{flox/flox(Tg-Nes-Cre)}* versus *Txnrd1^{wt/flox(Tg-Nes-Cre)}*. „hom“: *Txnrd1^{flox/flox(Tg-Nes-Cre)}*, „het“: *Txnrd1^{wt/flox(Tg-Nes-Cre)}*.

Gehirn	DNA-Chip	Cy3/Cy5- Markierung	Anzahl detektierter Gene	In <i>Txnrd1^{flox/flox(Tg-Nes-Cre)}</i> (hoch-reguliert/runter-reguliert)
1	a	hom/het	8.297	
	b	het/hom	8.937	
2	a	hom/het	8.086	
	b	het/hom	9.841	
3	a	hom/het	7.081	
	b	het/hom	10.541	
4	a	hom/het	7.608	
	b	het/hom	10.105	
5	a	hom/het	9.330	
	b	het/hom	9.835	
Zusammen			5.222	0 / 3 (p<0,01)
Analyse mit reduzierter Stringenz (Ausschluss drei schwächster Datensätze)				3 / 12 (p<0,01)

In einzelnen DNA-Chipphybridisierungen der vergleichenden RNA-Expressionsanalyse konnte für 7.081 bis 10.541 Proben ein detektierbares Signal gefunden werden. In allen zehn Wiederholungen der DNA-Chipphybridisierungen, einschließlich fünf

Farbumkehrexperimenten (umgekehrte Farbmarkierung der Targets), wurden 5.222 Proben mit Signalen auf allen DNA-Chips detektiert (Tabelle 5).

Basierend auf Erwartungen von statistischen Standardnormalverteilungen von Proben und Expressionsverhältnissen würde die Auswahl von 3 differentiell exprimierten Genen mindestens ein falsch positives Gen mit Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ beinhalten (Tabelle 5). Folglich konnten 3 signifikant differentiell exprimierte Gene detektiert werden, die in der homozygoten *Txnrd1*-Mutante im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren runter-reguliert waren.

Tabelle 6: Signifikant differentiell exprimierte Gene aus der RNA-Expressionsanalyse von 14 Tage alten Gehirnen von Mäusen des Genotyps *Txnrd1^{flox/flox}(Tg-Nes-Cre)* versus *Txnrd1^{wt/flox}(Tg-Nes-Cre)*. Ausschließlich runter-regulierte Gene (grün) in den homozygoten Mäusen konnten nachgewiesen werden.

Gen-Name	MG-Nummer	Gen-ID	Expr.-Verhältnis	p(Wert)	Gen-Name
<i>Txnrd1</i>	MG-15-260i19	MGI:1354175	$1,87 \pm 0,61$	$< 0,01$	Thioredoxinreduktase 1
unbekannt	MG-6-14e12	AI853839	$1,68 \pm 0,53$	$< 0,01$	unbekannt
unbekannt	MG-14-116l13	unbekannt	$1,73 \pm 0,39$	$< 0,01$	unbekannt

Das in der Mutante mit dem höchsten Faktor runter-regulierte Gen, bemessen an dem minimalen Expressionsquotienten in allen 10 Hybridisierungsexperimenten, ist das ausgeschaltete Gen *Txnrd1* selbst ($1,87 \pm 0,61$). Die beiden anderen Kandidatengene sind bisher unbekannt.

Aufgrund der geringen Anzahl an potentiellen Kandidatengenen wurde unter Vorbehalt eine erweiterte, weniger stringente Auswertungsanalyse durchgeführt, mit dem Ziel, einen weiteren Einblick in die Genregulation der homozygoten *Txnrd1*-Mutante zu erhalten. Für diese Analyse wurden jeweils drei (von zehn) Signale mit der am geringsten gemessenen Intensität für jede DNA-Chip-Probe aus der RNA-Expressionsprofilanalyse ausgeschlossen. Die Signifikanz der so erzeugten Ergebnisse ist geringer, da die Ergebnisse nun in nur sieben Experimenten die gleiche Expressionstendenz zeigen müssen. Aus diesem Grund wurde für die so erhaltenen Kandidatengene eine Literaturrecherche durchgeführt, um so die niedrigere statistische Relevanz mit bereits existierenden Informationen aus Literatur betreffend der Beziehung zum ausgeknockten Gen herstellen zu können. Durch die Herabsetzung der Stringenz erbrachte die erweiterte Analyse eine größere Anzahl, nämlich 15, an differentiell exprimierten Genen (3 hoch- und 12 runter-regulierte Gene in der homozygoten *Txnrd1*-Mutante; Anhang, Tabelle 13).

Bei der Betrachtung der bekannten Funktionen von diesen Genen wird deutlich, dass sie wahrscheinlich gehirnspezifisch exprimiert sind. Beispielsweise wurde in der erweiterten Analyse in den DNA-Chipexperimenten das Gen *Zic1* (*zink finger of cerebellum 1*; $1,74 \pm 0,42$) runter-reguliert, hingegen das Gen *Angiotensinogen* (*Agt*) $1,77 \pm 0,66$ -fach hoch-reguliert. Beide Gene sind an wichtigen Funktionen der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnregionen in der Maus beteiligt (siehe Diskussion, A.2). Darüber hinaus wurden zwei Riken-Klone und zwei noch unbekannte Gene identifiziert (Anhang, Tabelle 13).

Hinsichtlich der Genregulation von den *Txnrd1*-verwandten Genen *Txnrd2* und *Txnrd3* zeigte die Auswertung der RNA-Expressionsprofilanalyse keine signifikanten Veränderungen in der Expression.

A.4 RNA-Expressionsanalyse am Gewebe zweier Mausstämme, anhand des Vergleichs des Thymus der Mausstämme C3HeB/FeJ und C57BL/6J

Für die RNA-Expressionsanalyse, die im Rahmen einer standardisierten Phänotypisierung von Mausmodellen für die *German Mouse Clinic* (GMC) ihre Anwendung fand, wurde der Thymus der Mausstämme C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6) verwendet. Dieses Gewebe wurde ausgewählt, weil zuvor durchgeführte Analysen anderer Screens innerhalb des GMCs große Unterschiede in diesen Geweben zwischen den beiden Mausstämmen nach Futtereinschränkungen aufwiesen, vor allem in der Morphologie (Thymusatrophie; pathologische Analyse). Neun gleich alte Männchen (5x des Mausstamms C57BL/6J, 4x des Mausstamms C3HeB/FeJ; 105 ± 5 Tage alt) wurden für die RNA-Expressionsanalyse herangezogen. Dabei wurden sowohl RNAs einzelner Mäuse des einen Mausstammes mit einem RNA-Pool der Mäuse des anderen Stammes sowie RNA-Pools miteinander verglichen (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenstellung von 22 DNA-Chiphybridisierungen von Thymusgewebe der Inzucht-Mausstämme C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6).

Experiment	Cy3 - Markierung	Cy5 - Markierung	Detektierte Gene	Hoch-reguliert in C3H/B6
1	C3H-1	B6-pool	13.153	
2	C3H-2	B6-pool	17.431	
3	C3H-3	B6-pool	15.929	
4	C3H-4	B6-pool	11.830	
5	B6-pool	C3H-1	14.222	
6	B6-pool	C3H-2	15.906	
7	B6-pool	C3H-3	12.957	
8	B6-pool	C3H-4	10.312	
Zusammen			7.834	180/319 (p<0,01)
9	B6-1	C3H-pool	12.051	
10	B6-2	C3H-pool	16.941	
11	B6-3	C3H-pool	15.793	
12	B6-4	C3H-pool	14.613	
13	B6-5	C3H-pool	17.781	
14	C3H-pool	B6-1	15.152	
15	C3H-pool	B6-2	16.517	
16	C3H-pool	B6-3	16.512	
17	C3H-pool	B6-4	16.872	
18	C3H-pool	B6-5	16.891	
Zusammen			9.648	123/236 (p<0,01)
19	C3H-pool	B6-pool	14.961	
20	C3H-pool	B6-pool	16.323	
21	B6-pool	C3H-pool	17.217	
22	B6-pool	C3H-pool	15.179	
Zusammen			12.522	1273/2338 (p<0,01)
Zusammen in allen Experimenten			6.531	49/100 (p<0,01)

Die ermittelten Gene beziehen sich auf die Gesamtzahl der Spots mit detektierbaren Signalintensitäten auf individuellen Chips unter Verwendung der Software GenePixPro. 7.834, 9.648 und 12.522 Proben hatten hinreichend starke Signale, um die Spots auf allen Chips der verschiedenen Experimentreihen (C3H Individuen gegen B6-Pool, B6 Individuen gegen C3H-Pool und B6-Pool gegen C3H-Pool) zu erfassen (Tabelle 7). In den einzelnen DNA-Chiphybridisierungen konnte für 10.312 bis 17.781 Proben ein detektierbares Signal gefunden werden. In allen 22 DNA-Chiphybridisierungen, einschließlich 11 Farbumkehrexperimenten (umgekehrte Farbmarkierung der Targets) wurden 6.531 Proben mit Signalen auf allen DNA-Chips detektiert (Tabelle 7). Die Anzahl der Gene, die entweder im Thymus von C3H oder im Thymus von B6 reproduzierbar hoch- oder runter-reguliert waren, wurde für jede Experimentreihe und in allen Experimenten kalkuliert (Tabelle 7; Säule „hoch-reguliert in C3H/B6“). Basierend auf den Erwartungen von statistischen Standardnormalverteilungen von Proben und Expressionsverhältnissen, würde die Auswahl von 149 differentiell exprimierten Genen (49 hoch-reguliert in C3H; 100 hoch-reguliert in B6) mindestens ein falsch positives Gen mit der Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ beinhalten (in allen 22 Experimenten).

Basierend auf dem niedrigsten absoluten Verhältnis ihrer Signalintensität aus allen 22 DNA-Chiphybridisierungsexperimenten, ungeachtet der Reproduzierbarkeit, wurden die detektierten Gene in ihrer Rangfolge aufgelistet. Die Auswahl der 50 am stärksten differentiell exprimierten Gene enthielt zwei Gene mit nicht-reproduzierbarer Expression in Bezug auf die Hoch- oder Runterregulierung („nicht-gleichmäßige Muster“) in den 22 DNA-Chiphybridisierungsexperimenten. Die minimalen Expressionsverhältnisse für diese Auswahl reichten von 1,42- bis 3,36-fach (Tabelle 8).

Tabelle 8: Expressionsmusteranalyse aus RNA-Expressionsdaten von Thymusgewebe der Inzucht-Mausstämme C3HeB/FeJ und C57BL/6J.

Expressionsmusteranalyse aus RNA-Expressionsdaten			
Anzahl der Gene	Anzahl der nichtreproduzierbaren Gene	NDE $p < 0,01$	Bandweite der Expressionsverhältnisse (Minimum in 22 Experimenten)
1-10	0	≥ 1	3,36 – 2,29
1-20	0	≥ 1	3,36 – 1,97
1-30	1	≥ 1	3,36 – 1,70
1-40	1	≥ 1	3,36 – 1,54
1-50	2	≥ 1	3,36 – 1,42
1-100	22	≥ 1	3,36 – 1,17
1-150	56	≥ 1	3,36 – 1,14
1-200	103	≥ 1	3,36 – 1,10
1-300	195	≥ 1	3,36 – 1,08
1-500	383	≥ 1	3,36 – 1,05

Die Auswahl von 22 am stärksten differentiell exprimierten Genen zeigte dagegen nur reproduzierbare (keine nicht-reproduzierbaren) Expressionen. Diese nach stringenten Bedingungen erhaltenen 22 differentiell exprimierten Gene wurden für weitere Analysen verwendet (Anhang; Tabelle 14). An die Vorgaben der GMC angepasst, wurden die Expressionsverhältnisse aus den einzelnen DNA-Chiphybridisierungen gemittelt und die Standardabweichung angegeben. Anhand der Höhe der Expressionsverhältnisse der 22 Gene (8 Gene hoch-reguliert in C3H und 14 Gene hoch-reguliert in B6) wurde eine neue Rangfolge gebildet (Anhang; Tabelle 14).

Unter diesen Kandidatengenen war beispielsweise das in C3H im Vergleich zu B6 hoch-regulierte *Lymphozyten Antigen 6 Komplex*-Gen (*Ly6d*; Rang 1), *Slc28a2* (Rang 4) und die Thymus-spezifische Serin Protease (*Prss16*; Rang 7) bzw. das in B6 im Vergleich zu C3H hoch-regulierte spezifische Suppressorhomolog von *Ty16* (*Supt16h*; Rang 1), *Kallikrein 8* (Rang 4) und *Guanidinoacetatmethyltransferase* (*Gamt*; 12) (Anhang; Tabelle 14).

A.5 ***RNA-Expressionsanalyse von Gehirnen mit Creatin behandelte Mäuse***

Der Alterungsprozess und neurodegenerative Erkrankungen zeigen ähnliche neuropathologische Merkmale, wie z. B. die Beeinträchtigung des Energiemetabolismus und das Auftreten von Schäden durch freie Radikale (Hirsch and Faucheux, 1998; Kotake et al., 1995; Maruyama et al., 1999). Sogar unter physiologischen Bedingungen ist die mitochondriale Energieproduktion die Hauptquelle für die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS). Die natürlich vorkommende Substanz Creatin (Cr), welche Teil des mitochondrialen Energiepuffers und Transportsystems ist, kann möglicherweise die durch reaktive Sauerstoffverbindungen verursachten Zellschädigungen abschwächen. Die genauen Mechanismen über die Creatin wirkt sind noch unklar, man geht aber davon aus, dass sie wahrscheinlich über seine Funktion als Energielieferant hinausgehen. So zeigte sich, dass Creatin bei neurodegenerativen Erkrankungen tatsächlich einen dramatischen neuroprotektiven Effekt in Tiermodellen zu M. Parkinson, Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Muskeldystrophie, Schädelhirntrauma, usw. hat (Andres et al., 2005; Ellis and Rosenfeld, 2004; Ferrante et al., 2000). Wenn also die gleichen pathologischen Prozesse Neurodegeneration und Altern zu Grunde liegen und wenn Creatin im ersten einen positiven Effekt hat, dann könnte es auch bei letzterem hilfreich sein.

Im Rahmen einer groß angelegten Studie in der Maus (Zusammenarbeit mit Dr. A. Bender, PD Dr. T. Klopstock) wurde über einen Zeitraum von 12 Monaten Creatin zur Nahrung supplementiert (Cr-haltiges Futter (1 %)). 120 Inzuchtmäuse des Mausstamms C57BL/6J (1 Jahr alt) erhielten *ad libitum* entweder Creatin-haltiges Futter (n=60) oder äquikalisches Futter (n=60). 83 Mäuse wurden nicht behandelt und starben eines natürlichen Todes. Die 37 übrigen Tiere durchliefen einem neurologischen Phänotypisierungs-Screen und einen Verhaltens-Screen. Zusätzlich wurden 10 Tiere (5 Creatin supplementierte Tiere und 5 mit Placebo behandelte Tiere) für die Erstellung einer RNA-Expressionsprofilanalyse verwendet.

Es zeigte sich, dass die mit Creatin supplementierten Tiere zum Teil eine höhere Lebenserwartung hatten (10 % höhere Lebenserwartung) als die Kontrolltiere (613 Tage +/- 84 *versus* 563 +/- 95 Tage, $p < 0,02$). Außerdem zeigten die Cr-behandelten Tiere ein bedeutend niedrigeren Serum-Laktatwert (3,25 +/- 0,29 *versus* 4,11 +/- 0,21), was auf eine bessere motorische Leistung schließen lässt und darüber hinaus ein besseres Ergebnis in Objekt-Wiedererkennungstests.

Für die RNA-Expressionsanalyse wurde die isolierte RNA von 5 unbehandelten Tieren zu einem RNA-Pool (Kontroll-Pool) vereinigt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten, eine ausreichende Menge an RNA aus dem mit Cr-behandelten Tieren zu isolieren, konnten statt 10 nur insgesamt 7 DNA-Chiphybridisierungsexperimente durchgeführt werden. In den einzelnen DNA-Chiphybridisierungen konnte für 5.908 bis 11.113 Proben ein detektierbares Signal gefunden werden. In allen sieben DNA-Chiphybridisierungen, einschließlich zweier Farbumkehrexperimente (umgekehrte Farbmarkierung der Targets), wurden 2.642 Proben mit Signalen auf allen DNA-Chips detektiert (Tabelle 9).

Diese gemeinsamen Signalintensitäten wurden unter Verwendung von stringenten statistischen Kriterien mit Hilfe der LabView-Software hinsichtlich ihrer Signifikanz untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass kein signifikant differentiell exprimiertes Gen identifiziert werden konnte.

Tabelle 9: Zusammenstellung von 7 DNA-Chiphybridisierungen von Gehirnen mit Creatin-behandelter Mäuse versus unbehandelte Tiere.

Maus	Cy3 - Markierung	Cy5 - Markierung	Detektierte Gene	hoch-/ runterreguliert in Creatin-behandelten Mäusen
1	Creatin	Kontrolle	11.113	
2	Creatin	Kontrolle	9.442	
3	Creatin	Kontrolle	10.932	
4	Creatin	Kontrolle	6.840	
5	Creatin	Kontrolle	7.278	
1	Kontroll-Pool	Creatin	5.908	
2	Kontroll-Pool	Creatin	9.467	
Zusammen			2.642	0 / 0 (p<0,01)

B Vergleichende Analyse des Transkriptoms und Proteoms von Leber und Niere in der Maus

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass die verwendeten Analysen der Transkripte und Proteine keinesfalls der vollständigen Darstellung von Transkriptom bzw. Proteom gerecht werden. Die Verwendung der Ausdrücke Transkriptom- und Proteomanalyse dient im Folgenden nur der Vereinfachung.

Im Gegensatz zu einem Vergleich von gesundem mit krankem Gewebe bietet die Verwendung von verschiedenen Geweben, wie der Mausorgane Leber und Niere, für einen transkriptionellen Vergleich zum Proteom die Möglichkeit, eine größere Zahl von differentiell exprimierten Genen und Proteinen zu erhalten, mit dem Ziel aussagekräftigere Beschreibungen über die Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede von Transkriptom und Proteom herauszufinden. Eine vergleichende Transkriptom- und Proteomanalyse wurde dazu verwendet, zwei Hauptfragen zu beantworten:

- i. Korreliert die Proteinexpression mit der transkriptionellen Regulation?
- ii. Detektieren Transkriptom- und Proteommethoden Gene der gleichen funktionellen Kategorien?

Für eine vergleichende Analyse von Transkriptom und Proteom wurde eine Zucht von wildtypischen C3HeB/FeJ-Mäusen verwendet, welche unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten wurden. Für die durchzuführenden Analysen wurden Gewebeproben von Leber und Niere einer Maus so gewählt, dass die Ergebnisse der getrennt durchgeführten RNA- und Proteinanalysen, von annähernd identischem, biologischem Material erhalten werden konnten. Dabei wurden jeweils die linke Niere und der dorsale Leberlappen für die Transkriptomanalyse und die rechte Niere und der ventrale Leberlappen für die Proteomanalyse von 105 (+/- 5) -Tage alten männlichen Mäusen entnommen.

B.1 Differentielles Transkriptom von Leber und Niere in der Maus

Mit dem Ziel differentiell exprimierte Gene in Leber- und Nierengewebe der Maus zu identifizieren, wurde mit Hilfe von DNA-Chiptechnologie eine RNA-Expressionsprofilanalyse von diesen Organen durchgeführt. Hierfür wurden jeweils von drei gleich alten, adulten, männlichen Mäusen (Mausstamm C3HeB/FeJ) die entsprechenden Gewebe entnommen, die Gesamt-RNA isoliert und auf Qualität und Quantität überprüft. Für jede einzelne Maus wurden vier bzw. sechs DNA-Chiphybridisierungen, einschließlich Farbumkehrexperimente, durchgeführt, wobei jeweils die cDNA der Niere mit der cDNA der Leber auf einem DNA-Chip hybridisiert wurde (Tabelle 10).

Tabelle 10: Zusammenstellung von 16 DNA-Chiphybridisierungen von 3 adulten Maus-Leber- und Maus-Nierenproben.

Maus	DNA-Chip	Cy3/Cy5-Markierung	Anzahl detektierter Gene	Hoch in Leber / Hoch in Niere
1	a	Niere / Leber	17.964	
	b	Niere / Leber	17.797	
	c	Niere / Leber	16.118	
	d	Leber / Niere	19.151	
	e	Leber / Niere	18.846	
	f	Leber / Niere	19.592	
Zusammen für Maus 1			14.825	601 / 730
2	a	Niere / Leber	17.499	
	b	Niere / Leber	18.632	
	c	Niere / Leber	17.985	
	d	Leber / Niere	18.258	
	e	Leber / Niere	17.434	
	f	Leber / Niere	17.973	
Zusammen für Maus 2			14.533	291 / 855
3	a	Niere / Leber	15.577	
	b	Leber / Niere	16.092	
	c	Leber / Niere	18.001	
	d	Leber / Niere	16.646	
Zusammen für Maus 3			11.994	269 / 236
Zusammen für Maus 1-3			9.042	821 / 981

In den einzelnen DNA-Chiphybridisierungen der vergleichenden RNA-Expressionsanalyse konnte für 16.092 bis 19.592 Proben ein detektierbares Signal gefunden werden (Tabelle 10). Sechzehn DNA-Chiphybridisierungen einschließlich Farbumkehrexperimente (umgekehrte Farbmarkierung der Targets) wurden analysiert und dabei 9.042 Spots mit Signalen in allen DNA-Chips detektiert (Tabelle 10). Unter Verwendung von stringenten statistischen Kriterien wurden diese gemeinsamen Signalintensitäten mittels LabView-Software (siehe Kapitel: Ergebnisse A.1 DNA-Chiptechnologie) weiter mit dem Ziel untersucht solche Gene zu identifizieren, die mit hoher Signifikanz in ihrer Expression in Leber oder Niere überwiegen. Basierend auf Erwartungen von statistischen Standardnormalverteilungen von Proben und Expressionsverhältnissen würde die Auswahl von 1.802 differentiell exprimierten Genen mindestens ein falsch positives Gen mit der Wahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ beinhalten (Tabelle 10). Von diesen 1.802 differentiell exprimierten Genen sind 821 höher exprimiert in Leber im Vergleich zur Niere und 981 höher exprimiert in Niere im Vergleich zur Leber. Die gesamte Auflistung der differentiell exprimierten Gene in Leber- und Nierengewebe befindet sich in der wissenschaftlichen Publikation der Fachzeitschrift PNAS Zusatztable 2 (<http://www.pnas.org/cgi/content/full/0407672102/DC1>) (Mijalski et al. 2005).

Basierend auf dem niedrigsten absoluten Verhältnis ihrer Signalintensität aus allen 16 DNA-Chipexperimenten, ungeachtet der Reproduzierbarkeit, wurden die detektierten Gene in ihrer Rangfolge aufgelistet. In dieser Auflistung wurden in 470 am stärksten differentiell exprimierten Genen keine nicht-reproduzierbaren Genexpressionen gefunden. Die Auswahl von 500 am stärksten differentiell regulierten Gene enthielt nur ein (entspricht 0,2 %) nicht-reproduzierbar differentiell exprimiertes Gen in 16 DNA-Chiphybridisierungen (Tabelle 11). Diese 500 differentiell exprimierten Gene befinden sich alle oberhalb des Expressionsverhältnisses von 2,32 (Minimum der absoluten Expressionsfaktoren in allen 16 DNA-Chiphybridisierungen). Laut statistischer Berechnungen enthielt diese Auswahl mindestens ein nicht-differentiell exprimiertes (NDE) Gen mit einem Signifikanzlevel von $p < 0,01$. Die Zahlen für nicht-reproduzierbare Gene und erwartete NDE (falsch positive) Gene für $p < 0,01$ sind für verschiedene Auswahlen in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Expressionsmusteranalyse von RNA-Expressionsdaten von 3 adulten Maus-Leber- und Maus-Nierenproben. Gene mit Signalen in allen 16 Chip Experimenten wurden in Bezug auf die Signifikanz der differentiellen Genexpression beurteilt. Beschreibung siehe Text.

Expressionsmusteranalyse von RNA-Expressionsdaten			
Anzahl der Gene	Anzahl der nicht-reproduzierbaren Gene	NDE $p < 0,01$	Bandweite der Expressionsverhältnisse (Minimum in 16 Experimenten)
1 - 10	0	≥ 1	150,31 – 96,49
1 - 30	0	≥ 1	150,31 – 46,86
1 - 100	0	≥ 1	150,31 – 13,37
1 - 500	1	≥ 1	150,31 – 2,32
1 - 1000	22	≥ 1	150,31 – 1,46
1 - 1500	107	≥ 1	150,31 – 1,22
1 - 2000	331	≥ 2	150,31 – 1,13
1 - 5000	2853	≥ 2	150,31 – 1,03

Zusätzliches Vertrauen in die RNA-Expressionsdaten ergibt sich aus der Tatsache, dass einige als differentiell exprimiert identifizierte Gene durch mehrere unabhängige Proben auf dem DNA-Chip vertreten sind und diese nicht nur mit gleichen Tendenzen reguliert wurden, sondern sich auch mit ähnlichen Expressionsverhältnissen bestätigten (siehe Proben für *Cai*, *Scp2*, *Mup*, *Car3*, *Arg-1* und *Akr1a4*; Anhang, Tabelle 15). So tauchte beispielsweise das Gen *Mup* (*major urinary protein*) in vier unabhängigen Proben in der Rangliste der in Leber hoch exprimierten Gene im Vergleich zur Niere an Rang 5, 30, 32 und 41 (Anhang, Tabelle 15) auf. Darüber hinaus ist die Spezifität der Proben, die für den DNA-Chip verwendet wurden, erst kürzlich in unserem Labor experimentell bewertet worden (Drobyshev et al., 2003b).

B.2 *Differentielles Proteom von Leber und Niere in der Maus*

Für eine vergleichende Analyse des Proteoms von Leber und Niere wurden die geteilten Organhälften von Maus 1 verwendet, so dass die Proteindaten aus identischem, biologischem Material wie die RNA-Daten stammen (Tabelle 10). Zum Nachweis von Proteinen, die im Vergleich in dem einen Gewebe höher exprimiert sind als in dem anderen wurde eine hochauflösende 2D-Gelelektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten von 4-7 und 6-11 in einer Dimension durchgeführt (Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Halder, Dr. Alois Harder und Michael Kersten; TopLab, Martinsried). Dabei wurden die Proteine in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten nach ihrer Größe aufgetrennt. Um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten, wurden insgesamt fünf Wiederholungen pro Gewebe und Gradient angefertigt. Die Ergebnisse dieser fünf 2D-Gelelektrophoreseexperimente von Leber- und Nierenproteinextrakten wurden zu einem Mastergel unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Bildanalysesoftware (Proteomweaver, Definiens) *in silico* zusammengestellt. Die in Mastergelen enthaltenen Spots, die sowohl in Leber- und Nierenextrakten detektiert werden konnten, wurden übereinander gelegt und für jeden pH-Gradienten quantifiziert (Abbildung 11). Insgesamt konnten mittels der 2D-Gelelektrophorese zusammen in beiden pH-Gradienten 2445 Spots aus Leberproteinextrakten im Vergleich zu 2261 Spots aus Nierenproteinextrakten nachgewiesen werden (Abbildung 11).

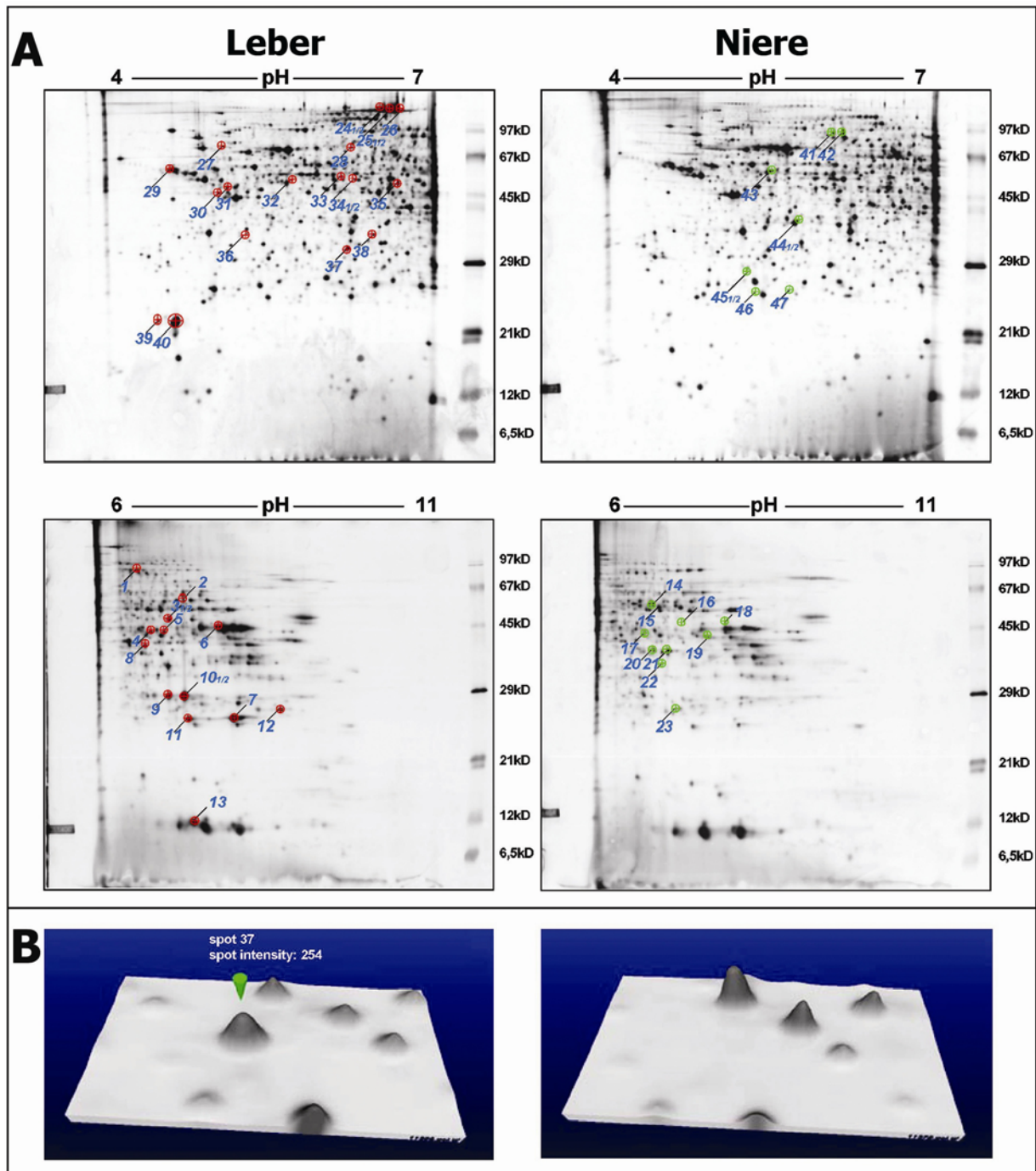


Abbildung 11: Mastergele von Leber- und Nierenextrakten aus der Maus (A) und beispielhafte Darstellung eines zur Identifizierung ausgewählten differentiell exprimierten Proteinsignals (B). (A) Jedes Bild ist ein digitales Mastergel, welches von fünf 2D-Gele für pH 4-7 und 6-11 von identischen Proteinextrakten unter Verwendung der Software Proteomweaver (Definiens) *in silico* hergestellt wurde. Proteine, die im Vergleich zu jeweils anderem Gewebe in der Leber oder Niere höher exprimiert waren, sind jeweils in rot oder grün umkreist. Die markierten Proteine sind solche, die für die Peptid-Massenanalyse ausgeschnitten wurden. Kleinschriften (3_{1/2}, 10_{1/2}, 24_{1/2}, 25_{1/2}, 34_{1/2}, 44_{1/2}, 45_{1/2}) zeigen Spots, welche zwei verschiedene Proteine basierend auf Analyse der Peptidmassen enthalten. (B) Visualisierung der Spot-Quantifizierung durch das Programm Proteomweaver (Spot #37) in der Leber (links) und Niere (rechts). Dieses Protein (Nudt7) hat in der Leber eine Spotintensität von 254 und konnte nicht in 2D-Gele von Proteinextrakten der Niere detektiert werden.

Um gewebespezifische Proteinexpression detektieren zu können, wurde die Quantität eines jeden Spots zwischen Leber- und Nierenproteinextrakten in den Mastergelen miteinander verglichen. Mit einem Faktor von mindestens 1,5-fach waren 439 Spots in der Leber höher exprimiert im Vergleich zur Niere und in der Niere 366 Spots höher exprimiert als in der Leber. Statistische Kalkulationen wurden mit Hilfe der Software Proteomweaver durchgeführt, welche eine Standardabweichung in den fünf Wiederholungsexperimenten von weniger als 30 % und ein Vertrauensintervall von $p < 0,05$ im T-Test zulässt. Diese Kriterien zugrunde legend wurden 47 verschiedene Spots für die Identifizierung mittels Massenspektroskopie ausgewählt. Sieben Spots detektierten zwei verschiedene Proteine (Abbildung 11 (A)). Die Massenspektroskopie von drei Spots konnte nicht zur Identifizierung von bekannten Proteinen führen. Insgesamt konnten mit Hilfe dieser Analyse 51 Proteine bestimmt werden (33 Proteine aus der Leber, 18 Proteine aus der Niere; Anhang, Tabelle 15).

Sechs Proteine (Krt1-18, Cps1, Mup1, Car3, Vil und Akr1a4) wurden in zwei bzw. drei Spot-Präparationen identifiziert, was darauf hindeutet, dass diese stark differentiell exprimierten Proteine entweder in verschiedenen Isoformen vorliegen oder *post*-translationalen Modifikationen in der Leber bzw. Niere unterzogen sind. Die 51 identifizierten Proteine repräsentieren somit 43 verschiedene Proteine (Anhang, Tabelle 15). Um die Richtigkeit und Signifikanz dieser Proteine zu überprüfen, wurden sie auf Beteiligung an Leber- bzw. Nierenspezifischen biologischen Prozessen in Kommentierungen öffentlicher Datenbanken und Publikationen überprüft. Es hat sich gezeigt, dass viele der stark differentiell exprimierten Proteine charakteristische Marker für die untersuchten Gewebe sind. So zum Beispiel Villin (*Vil*), ein Aktin-bindendes Strukturprotein, welches in den Mikrovilli von Bürstensäumen in proximalen Tubuli der Nieren lokalisiert ist (Athman et al., 2003; Pinson et al., 1998). Villin wurde als hoch-reguliertes Protein in der Niere im Vergleich zur Leber in zwei Isolierungen in 2D-Gelen des pH-Bereichs 4-7 identifiziert. Ein anderes Protein, Aldehydreduktase (*Akr1a4*), war unter den in der Niere hoch-regulierten Proteinen im Vergleich zur Leber in 2D-Gelen des pH-Bereichs 6-11 und konnte in zwei Spot-Präparationen identifiziert werden. Das auch auf der RNA-Ebene in der Niere im Vergleich zur Leber hoch-regulierte Gen *Akr1a4* spielt bei der Entgiftung von reaktiven Zwischenprodukten von Aldehyd eine Rolle (Allan and Lohnes, 2000; Takahashi et al., 1993). Das Intermediärfilament Keratin 18 (*Krt1-18*, Keratin-Typ I Cytoskelett) war im Vergleich zur Niere eines der am stärksten hoch-regulierten Proteine in der Leber und wurde in zwei Spot-Isolierungen von 2D-Gelen im pH-Bereich 4-7 identifiziert. Mutationen in Keratin 18, welches im Epithel der Leber exprimiert

wird, wurden als Risikofaktoren für die Ausbildung von Lebererkrankungen (multiple Ätiologie) erkannt (Ku et al., 2003; Moll et al., 1982).

Eines der ebenso exprimierten Proteine, welches in drei unabhängigen Isolierungen aus der Leber identifiziert wurde, ist Carbomoyl-phosphat Synthetase I (*Cps1*). *Cps1* ist ein Enzym des Harnstoffwechsels (*hepatic urea*-Zyklus) und verantwortlich für die Entgiftung von Ammoniak. Eine DNA-Chipexpressionsprofilanalyse von mehr als 90 Geweben der Maus und des Menschen sowie von Zelllinien hat gezeigt, dass Transkripte von diesem Gen hoch-exprimiert in der Leber vorkommen. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die begrenzte Expression von *Cps1* in Hepatozyten effizient den Bereich des Harnstoffwechsels der Leber begrenzt (Schofield et al., 1999; Su et al., 2002). Ein weiteres Protein, Carbonic Anhydrase 3 (*Car 3*), welches in drei Isoformen oder Modifikationen in 2D-Gelen des pH-Gradienten 6-11 detektiert wurde, kommt in einer Vielzahl von Geweben vor, wo es in physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Gluconeogenese, Ureagenese und der Bildung von Gallensäure involviert ist (Parkkila et al., 2002). *Car 3* war in der Leber hoch-exprimiert, konnte aber in der 2D-Gelelektrophorese von Nierengewebe nicht nachgewiesen werden. Mit der gleichen Tendenz ist auch das Major Urinary Protein 1 (*Mup1*) in den 2D-Gelen exprimiert, das einer Familie von Multigenen auf Chromosom 4 der Maus angehört. *Mup1* wird in der Leber synthetisiert, sekretiert und mit dem Urin ausgeschieden. Es ist ebenso in verschiedenen sekretorischen Geweben exprimiert (Clark et al., 1985; Shaw et al., 1983). Die Untersuchung und die funktionelle Beschreibung dieser als differentiell exprimiert identifizierten Proteine unterstützt die Annahme, dass diese Proteine in spezifischen biologischen Prozessen der Leber bzw. Niere involviert sind.

B.3 Funktionen von Leber- und Nierenspezifischen Transkripten und Proteinen

Um die Funktion von Leber- und Nierenspezifischen Transkripten und Proteinen vergleichen zu können, wurden die funktionellen Annotationen (biologische Prozesse und molekulare Funktionen) von allen identifizierten Proteinen (43 Proteine) und den 100 am stärksten differentiell exprimierten Transkripten aus der *Mouse Genome Informatics*-Datenbank (MGI-Datenbank) zusammengefasst (Abbildung 12; Anhang, Tabelle 15). Mehr als 70 % der in Leber oder Niere mittels Gelelektrophorese und Massenspektroskopie identifizierten Proteine wurden als metabolische Enzyme bzw. als mit Biosynthese assoziierte Proteine beschrieben. Die Mehrzahl der übrigen funktionell beschriebenen Proteine sind entweder Transport- (10 % in der Leber, 6 % in der Niere) oder Strukturproteine (7 % in der Leber, 6 % in der Niere)

(Abbildung 12). Die funktionellen Kategorien unter den Transkripten werden von den metabolischen Enzymen weniger dominiert (12 % in der Leber, 14 % in der Niere). Sie teilen sich hingegen in mehrere verschiedene funktionelle Annotationen auf. Beispielsweise in Gene, die für Proteininhibitoren bzw. Proteasen kodieren und Proteine, die mit Apoptose assoziiert sind. Im Speziellen haben 14 % der leberspezifischen Transkripte verschiedene individuelle Funktionen. Unter den differentiell exprimierten Transkripten befinden sich 22 % aus der Leber und 36 % aus der Niere, zu denen keine funktionelle Beschreibung in der MGI-Datenbank existiert. Im Gegensatz dazu befinden sich unter den identifizierten Proteinen nur 8 % in der Leber und 0 % in der Niere, die funktionell nicht beschrieben sind (Abbildung 12). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Methoden zur Detektion von differentiell exprimierten Transkripten und Proteinen aus dem Leber-/Nierenvergleich die funktionellen Klassen mit verschiedenen Präferenzen detektieren.

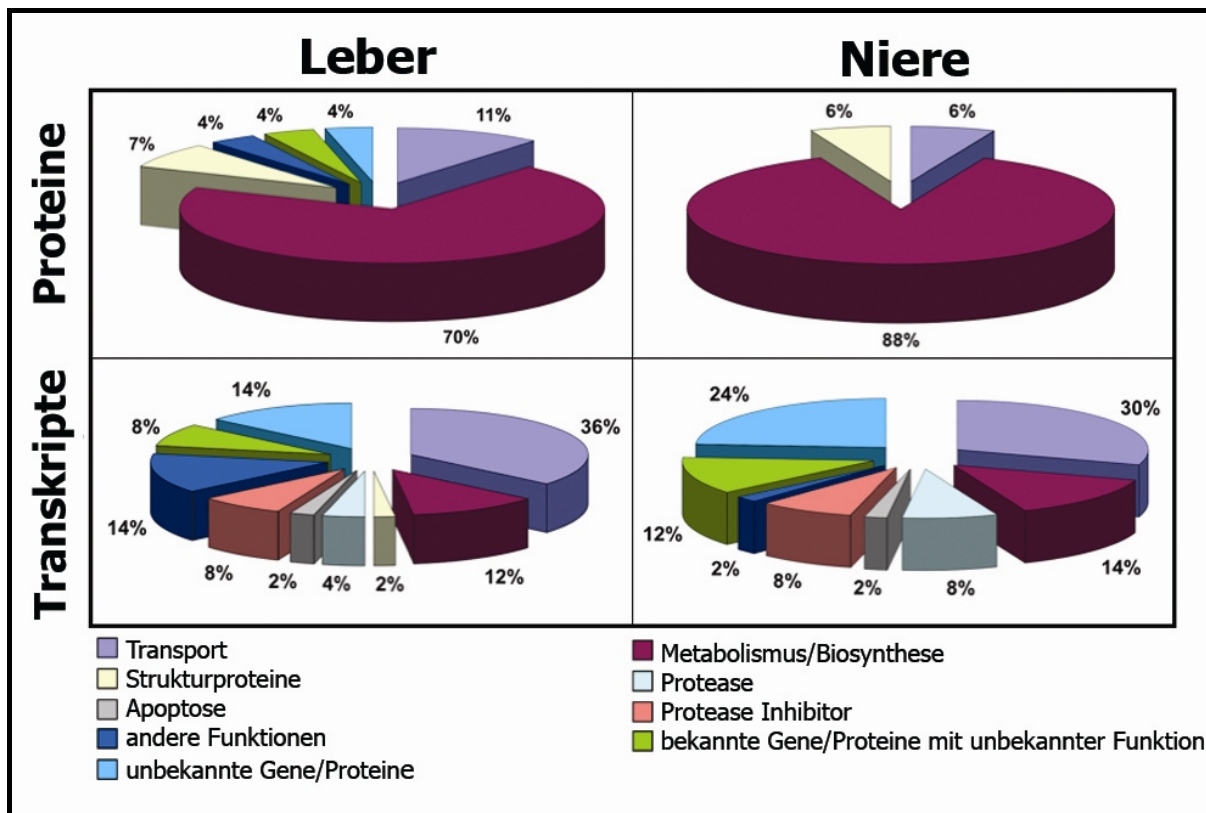


Abbildung 12: Darstellung der funktionellen Kategorien, der in der Leber bzw. Niere differentiell exprimierten Gene auf Transkript- und Proteinebene. Die vorliegenden Daten basieren auf den 100 am stärksten differentiell exprimierten Transkripten und den 43 verschiedenen in der Leber oder Niere identifizierten Proteinen. Die Klassifizierung wurde von der MGI-Datenbank abgeleitet.

B.4 Vergleichende Analyse von differentiell exprimierten Transkripten und Proteinen

Für den Vergleich der exprimierten Transkripte und Proteine wurden die identifizierten differentiell exprimierten Proteine aus Leber und Niere auf die differentielle Regulation auf der RNA-Ebene überprüft. Von den 43 identifizierten Proteinen waren 37 durch mindestens eine Probe in den Microarrays repräsentiert. 9 Gene wurden von zwei (*Cai*, *Scp2*, *Actr3*, *Car3*, *Arg1*, *Hmgcs2* und *Akr1a4*), drei (*Acox1*) oder vier (*Mup*-Genfamilie) Proben vertreten (Anhang, Tabelle 15). Bei der *Mup*-Genfamilie war es weder bei der Proteinsequenz noch bei der DNA-Probensequenz möglich, eindeutig zwischen individuellen Genfamilienmitgliedern zu unterscheiden. Proben von identischen Genen haben entweder nicht oder nur teilweise überlappende (weniger als 50 %) Sequenzen. In den Fällen, in denen mehrere DNA-Proben für identische Gene vorlagen, ließen die RNA-Expressionsergebnisse, mit Ausnahme von einer Probe für *Hmgcs2* (MG-11-1e11), auf ähnliche Genexpressionslevels schließen (siehe zum Beispiel die Proben für *Mup*-Gene, *Acox1* und andere; Anhang, Tabelle 15). *Hmgcs2* gab in keinem der DNA-Chipexperimente ein Hybridisierungssignal. Die Eintragungen in *Genbank*[®] (Gen-Datenbank des NCBI) für *Hmgc2*-mRNA zeigten verschiedene Spleißvarianten, welche entweder die Sequenz der Probe auf dem DNA-Chip enthalten (e.g., AK004865) oder nicht (AK004902). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur Spleißvarianten, denen der Bereich vom zweiten bis zum letzten Exon von *Hmgc2* fehlt, eine starke Expression in der Leber von adulten Mäusen zeigten.

In der Leber waren 18 von 24 Proteinen (75 %), die für die DNA-Proben vorlagen, im Vergleich zur Niere auch bedeutend höher auf dem Transkriptionslevel reguliert. Zusätzlich zeigten DNA-Chipexperimente für drei Gene (*Rad23b*, *Krit1-18* und *Gpt1*) reproduzierbare Hoch-Regulation in allen RNA-Expressionsprofilen und in allen Spots, die für diese Proben identifiziert werden konnten. Für zwei Gene (*Rnf20* und *Actr3*), die auf dem Proteinlevel differentiell exprimiert waren, zeigte die DNA-Chipanalyse keine differentielle Regulation (Anhang, Tabelle 15). Bei dem unbekannten Gen gb|BC026366 zeigten nur 2 von 16 DNA-Chiphybridisierungen ein Signal, welches ausreichend stark war, um die gespottete DNA-Probe zu detektieren. Für dieses Gen erlaubten die wenigen zur Verfügung stehenden Daten keine Aussage über dessen transkriptionelle Regulation.

Insgesamt 13 von 18 in der Niere hoch-regulierten Proteinen wurden mindestens von einer Probe in den DNA-Chips repräsentiert. Fünf von diesen Genen (38 %) waren auf RNA-Ebene in der Niere im Vergleich zur Leber (*Atp6v1b2*, *Arbp*, *Akr1a4*, *Oxct* und *Tpi*) bedeutend stärker hoch-reguliert. Außerdem zeigten zwei Gene (*Vil* und *Ldh1*) eine eindeutige Tendenz

überwiegend in der Niere exprimiert zu sein. Beide waren aber entweder nicht in allen DNA-Chips detektierbar oder umgekehrt auf einem der 16 DNA-Chips reguliert (Anhang, Tabelle 15). Das Gen *Acox1* zeigte bei der Auswertung der DNA-Chipexperimente die Tendenz, höher in der Niere im Vergleich zur Leber exprimiert zu sein. Aufgrund der in der DNA-Chipanalyse zugrunde liegenden stringenten Analysekriterien reichte dieses tendenzielle Verhalten nicht aus, um *Acox1* als differentiell reguliert einzustufen (Anhang, Tabelle 15). Interessanterweise sind die in Nierenproteinextrakten detektierten Gene *Fumarate hydratase 1 (Fh1)* und *fumarylacetoacetate hydrolase (Fah)* sehr stark in der Leber, aber nicht in der Niere transkribiert. Dieses Ergebnis deutet auf eine reverse Regulation auf der Transkript- und Proteinebene hin. Das RNA-Expressionsprofil der verbleibenden drei Gene *Mtx2*, *Tpk1* und *Dnahc11* lässt hingegen auf keine differentielle Regulation schließen, obwohl die Transkripte von *Tpk1* und *Dnahc11* nachweislich stärker hoch-reguliert in der Niere als in der Leber von Maus 1 (wurde für die Proteinanalyse verwendet) waren. Obwohl die transkriptionelle Regulation für die Mehrheit der untersuchten Gene positiv mit der translationalen Regulation korrelierte, konnte dieser vergleichende Ansatz ebenfalls zeigen, dass bestimmte Proteine auf der Transkriptebe-
 ne entweder nicht differentiell reguliert waren oder die umgekehrte transkriptionelle Regulation aufzeigten (Anhang, Tabelle 15).

Zusammenfassend wurden von 37 Proteinen, die durch eine Probe auf dem Microarray repräsentiert waren, 29 Gene (79 %) entweder deutlich und mit der gleichen Tendenz in allen DNA-Chips (18 in der Leber und 5 in der Niere) oder in den meisten DNA-Chips (3 in der Leber und 3 in der Niere) reguliert. Weiterhin waren 5 Gene nicht transkriptionell reguliert und 2 der differentiell exprimierten Proteine umgekehrt in den DNA-Chips reguliert (Abbildung 13). Für ein differentiell exprimiertes Protein erlaubten die DNA-Chipdaten die Beurteilung der transkriptionellen Regulation, aufgrund eines zu geringen Genexpressionslevels, nicht. Obwohl die transkriptionelle und translationelle Regulation für die Mehrzahl der Gene positiv korrelierte, zeigt diese vergleichende Methode ebenfalls, dass einige Proteine entweder transkriptionell nicht differentiell reguliert werden oder eine umgekehrte transkriptionelle Regulation zeigen.

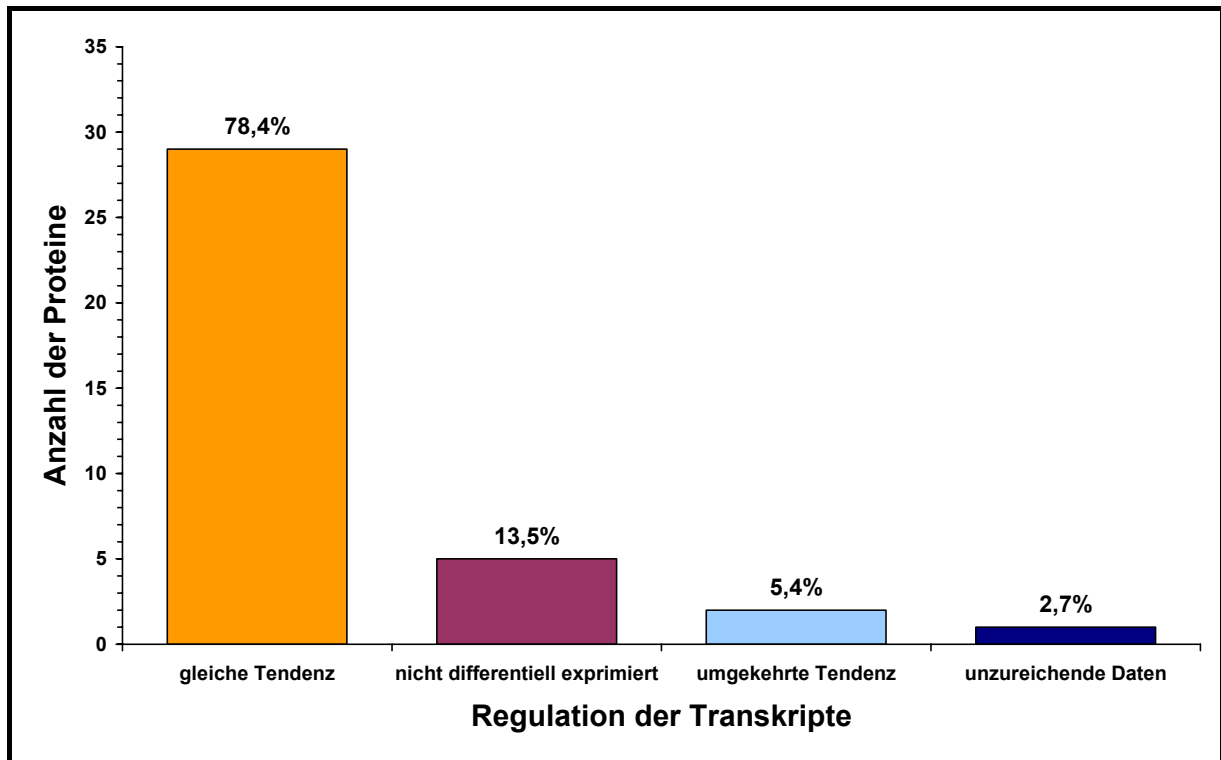


Abbildung 13: Vergleich der am stärksten differentiell exprimierten Proteine mit den regulierten Transkripten. 29 Gene zeigten die gleiche Tendenz auf der Transkriptebene (orange), fünf waren nicht differentiell auf der Transkriptebene reguliert (lila), zwei waren umgekehrt reguliert (hellblau) und ein Gen war zu schwach auf der RNA-Ebene exprimiert, um eine Zuordnung durchzuführen (dunkelblau).

C Chromosomale Co-Lokalisation von differentiell exprimierten Genen in Leber- und Nierengewebe der Maus

Die Analyse des Transkriptoms mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie der zwei funktionell verschiedenen Gewebe, Leber und Niere, führte zur Identifizierung von weit mehr als 1.000 signifikant differentiell exprimierten Genen. Aufgrund der hohen Anzahl an Genen, die offensichtlich in einem biologischen Zusammenhang stehen, ergab sich eine Chance, diese hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation zu untersuchen. Während dieser Analyse wurden die Gene des Serin Protease Inhibitor (*Serpin*) Clusters identifiziert, die nachweislich co-exprimiert werden. Die Gene *Serpina10* (Rang 59 basierend auf dem geringsten Verhältnis in 16 DNA-Chipexperimenten; Anhang, Tabelle 15), *Serpina1b* (*Spil-2*, Rang 30), *Serpina1d* (*Spil-4*, Rang 60), *Serpina1a* (*Spil-1*, Rang 74), und *Serpina1e* (*Spil-5*, Rang 52), die dem orthologen humanen proximalen *SERPIN*-Subcluster entsprechen, zeigten starke Expression in der Leber, aber nicht in der Niere (Forsyth et al., 2003). Die chromosomale Anordnung dieser Gene ist zwischen Maus und Mensch konserviert mit der Ausnahme, dass offenbar in der Maus fünf Isoformen des humanen *SERPINA1*-Gens existieren (Goodwin et al., 1997). Das humane *SERPIN2*-Gen (*ATR*), welches zwischen den Genen *SERPINA1* und *SERPINA6* lokalisiert ist, hat ein von *SERPINA2* stark abweichendes Ortholog in der Maus (Forsyth et al., 2003). In den DNA-Chipexperimenten konnte die Expression des *ATR* weder in der Leber noch in der Niere nachgewiesen werden. Erst kürzlich wurde eine Kontrollregion im humanen Locus von *SERPIN* identifiziert, das für die Genaktivierung und Chromatinumbildung von mindestens dem gesamten proximalen Subcluster verantwortlich ist und welches von den Genen gebildet wird, die aus der DNA-Chipanalyse als differentiell reguliert hervorgegangen sind (Marsden and Fournier, 2003). Eine Co-Regulation von dicht miteinander gekoppelten Genen durch anteilige *cis*-regulatorische Elemente (solche wie LCR's, Enhancer, Repressoren, Insulatoren, MARs, SARs usw.) wurde schon für andere Genfamilienmitglieder wie *apoE*-, *alpha-globin*-, *beta-globin*- und *Hox*-Gene beschrieben (Allan et al., 1997; Engel and Tanimoto, 2000; Li et al., 1999; Spitz et al., 2003).

Die Identifizierung des Serpin-Genclusters auf der Basis der DNA-Chipanalyse bekräftigte eine systematische Untersuchung der differentiell exprimierten Gene auf chromosomale Lokalisation, um bekannte und neue potentielle Cluster von co-exprimierten Genen aufzuzeigen. Die chromosomale Lokalisation wurde durch das Vergleichen der Probensequenz in der Mausgenom-Datenbank *mouseBLAT* auf dem *UCSC-Genome-Browser* (Stand vom Oktober 2003) festgestellt (Kent, 2002). Basierend auf den 200 am stärksten differentiell exprimierten Genen in Leber bzw. Niere (Ergebnisse, B.1) wurden 25

genomische Regionen identifiziert, die zwei oder drei co-exprimierte Gene innerhalb von weniger als einer Megabase (Mb) (nummeriert mit 1-25 in Abbildung 14) und 4 Regionen mit vier oder fünf co-exprimierten Genen innerhalb von weniger als 2 Mb (markiert mit A-D in Abbildung 14) aufwiesen.

Unter Verwendung von *in silico*-Simulationen (n=10.000) von Zufallsverteilungen von 200 Punkten („Genen“) innerhalb von 2,5 Gb (Größe des Mausgenoms (Waterston et al., 2002)), wurde für den Vertrauensbereich >95 % die Wahrscheinlichkeit, mindestens 29 Regionen von 1 Mb mit 2 zufällig ausgewählten Genen mit $p < 0,0005$ und von 2 Mb mit 4 oder mehr zufällig ausgewählten Genen mit $p < 0,0005$ erhalten. Diese Simulation beinhaltet einige Vereinfachungen, wie z. B. die Vernachlässigung der Größe der Gene in Relation zum Genom und die Annahme der gleichmäßigen Verteilung der Gene innerhalb des Genoms. Folglich wurde eine zweite Simulation, die auf der publizierten Mausgenomsequenz und auf den Annotierungen beruht, durchgeführt. Für diese Simulation wurden 10.000 Verteilungen von 200 zufällig aus einer Liste von allen bekannten Genen der *Maus Assembly* (Stand: Mai 2004) ausgewählten Gene analysiert (Karolchik et al., 2003; Karolchik et al., 2004). Für jeden Lauf wurde die Frequenz aufgezeichnet, mit der mindestens 29 nicht-überlappende Fenster von 1 Mb (bzw. 2 Mb), die mindestens 2 Gene (bzw. mindestens 4 Gene) beinhalten, gefunden wurden. Der Vertrauensbereich von 95 % zeigte, dass die Co-Lokalisation signifikant ist, da die Wahrscheinlichkeit 29 kleine Cluster (2 Gene innerhalb 1 Mb) bzw. vier große Cluster (4 Gene innerhalb 2 Mb) zufällig zu finden $p < 0,03$ bzw. $p < 0,007$ ist (Zusammenarbeit mit Dr. T. M. Strom, Dr. H. V. Liebscher, GSF, Neuherberg).

Die räumliche Organisation und evolutionäre Konservierung von solchen Genclustern deutet möglicherweise auf gemeinsame genregulatorische Funktionen hin. Mitglieder von mindestens 10 Clustern sind paraloge Gene von 8 Genfamilien (*Carbonic anhydrases* (*Car*, Cluster 2), *Fibrinogen* (*Fg*, Cluster 3), *Apolipoprotein* (*Apo*, Cluster 6 und 13), *Cytochrome P 450 Familie 2* (*Cyp2*, Cluster 7 und 20), *Kallikrein* (*Klk*, Cluster 8), Serin Protease Inhibitor (*Serpin*, Cluster D), *Inter-alpha Trypsin Inhibitor* (*Itih*, Cluster 18), und *Solute Carrier* (*Slc*, Cluster 24).

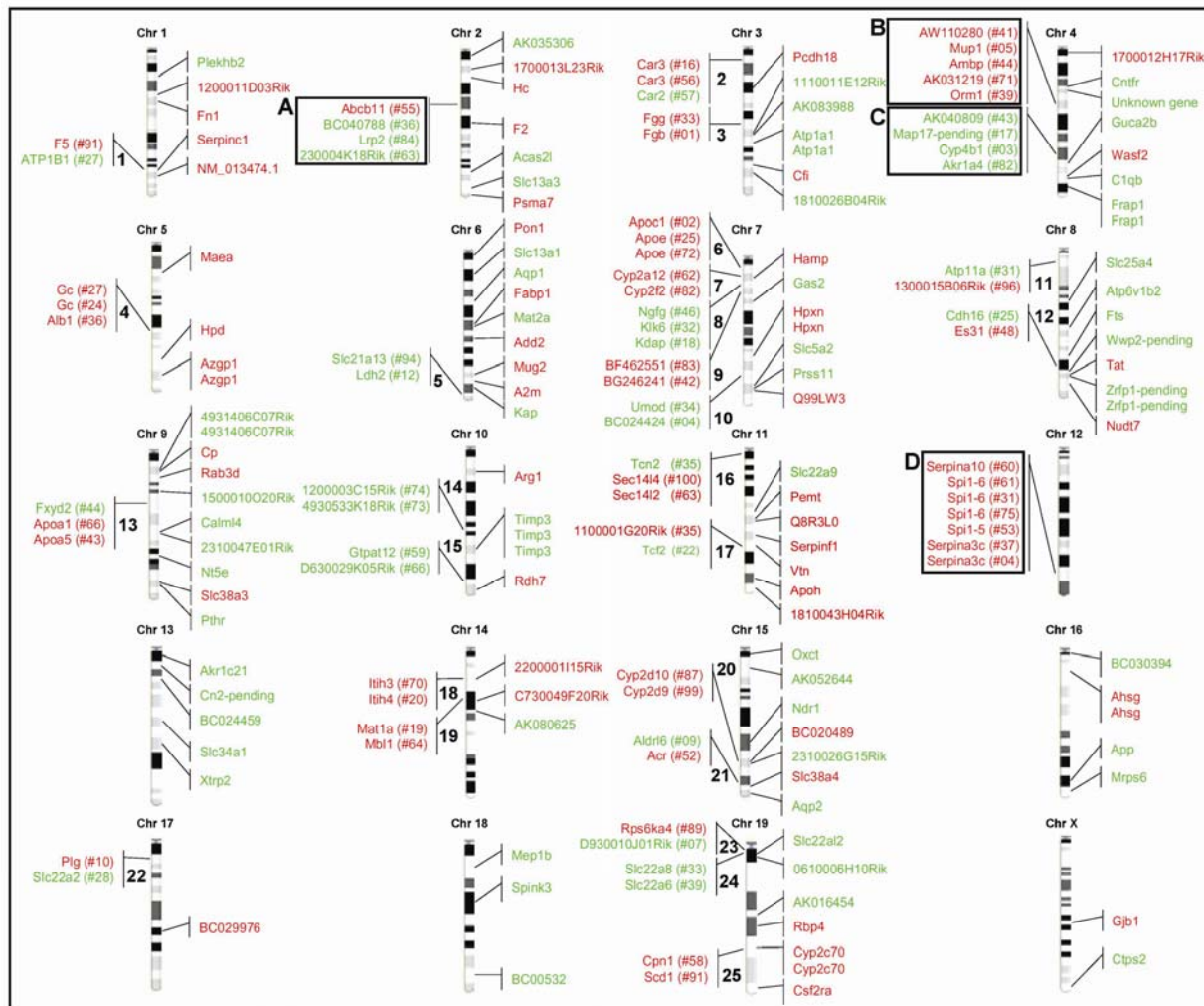


Abbildung 14: Chromosomale Lokalisation der 200 am stärksten differentiell exprimierten Gene basierend auf DNA-Chipexpressionsdaten. Die Top 100 Gene, die relativ gesehen stärker in der Leber exprimiert waren, sind in rot gezeigt; die Top 100 in der Niere höher exprimierten Gene sind hingegen grün gekennzeichnet. Genomische Regionen mit regulierten Genen, die als Cluster beschrieben werden, werden links von jedem Chromosom gezeigt. Gene, die nicht mit den anderen Top 200 differentiell exprimierten Genen colokalisiert sind, befinden sich auf der rechten Seite eines jeden Chromosoms. Bei 14 Proben führten Recherchen mit der Nukleotidsequenz in der öffentlich zugänglichen Mausgenomdatenbank *mouseBLAT* auf dem *UCSC-Genome-Browser* zu keiner Übereinstimmung mit einer spezifischen Sequenz.

Um einige Cluster von co-exprimierten Genen detailliert zu beschreiben, wurden für weitere Analysen sowohl die Genregionen involviert, die sich zwischen den Genen befinden und solche, die die Gencluster flankieren. So wurde zum Beispiel das Apolipoprotein-Cluster auf dem Mauschromosom 7 identifiziert. Apolipoproteine sind evolutionär konserviert und in der Maus und im Menschen in Clustern lokalisiert (Hoffer et al., 1993; van Eck et al., 1994), was darauf hindeutet, dass dieser räumlichen Organisation möglicherweise eine funktionelle Relevanz zu Grunde liegt. In der Maus sind *Apoe*, *Apoc1*, *Apoc4*, und *Apoc2* in einem Bereich von ungefähr 20 kb in der proximalen Region von Chromosom 7 und in der gleichen transkriptionellen Orientierung lokalisiert. Die Untersuchung der Apolipoproteine nach der Höhe ihrer Genexpression ergab, dass alle Genmitglieder in der Leber höher exprimiert im

Vergleich zur Niere vorkamen. Das Gen *ApoE* war durch zwei Proben auf dem DNA-Chip repräsentiert (Rang 72 und 25 in 16 DNA-Chipexperimenten basierend auf dem Minimum der maximalen Verhältnisse in Leber versus Niere; [Mijalski et al. 2005](#), Zusatztabelle 2; <http://www.pnas.org/cgi/data/0407672102/DC1/2>). Die Gene *Apo21*, *Apoc4*, und *Apoc2* wurden jeweils von einer einzelnen Probe dargestellt (Rang 2, 225; bzw. 104; [Mijalski et al. 2005](#), Zusatztabelle 2). Durch jeweils eine einzelne Probe auf dem DNA-Chip vertreten waren ebenfalls die stromabwärts und -aufwärts flankierenden Gene des Apolipoprotein-Clusters *Tomm40* und *Clptm1*, die in der gleichen transkriptionellen Orientierung vorlagen. Sowohl *Tomm40* als auch *Clptm1* waren zwischen Leber- und Nierengewebe nicht differentiell reguliert gewesen, was darauf schließen lässt, dass sich die differentielle Expression exklusiv auf die Gene des Apolipoprotein-Clusters beschränkt.

D Analyse der Promotorregion des *Dll1*-Gens in transgenen Mäusen

Die dynamische Expression des *Dll1*-Gens in verschiedenen Geweben und Zellen unterschiedlichen Typs in der Maus ist ein Hinweis darauf, dass die zeitliche und räumliche Expression dieses Gens durch spezifische Transkriptionsfaktoren und deren Kombination gesteuert wird. Die transkriptionelle Regulation des *Dll1*-Gens, die zu diesem komplexen Genexpressionsmuster führt, wurde bereits in vorangegangenen Promotorstudien an transgenen Mäusen untersucht (Beckers et al., 2000).

Das für diese Analysen verwendete Transgen (*Dll1^{tg4.3/lacZ}*) bestand aus 4,3 kb der nicht translatierten Sequenz von *Dll1* stromaufwärts der kodierenden Region in Verbindung mit dem ersten Codon des *Dll1*-Gens (das Leseraster wurde dabei eingehalten), dem *E. coli LacZ*-Gen, dem SV40 und dem PGK-Polyadenylierungssignal. Um die Expression des Transgens mit der endogenen Expression vergleichen zu können, wurde das *Dll1-LacZ-knock-in* Allel (*Dll1^{lacZ}*) verwendet, welches das Reportergen *LacZ* im Bereich des endogenen *Delta1*-Locus exprimiert (Hrabe de Angelis et al., 1997).

Mit dieser Analyse konnte zunächst gezeigt werden, dass genomische Sequenzen von 4,3 kb stromaufwärts der kodierenden Region ausreichen, um die wichtigsten Aspekte der *Dll1*-Expression von der Gastrulation bis zur frühen Embryogenese zu reproduzieren (Beckers et al., 2000). Demnach ist der Bereich von 4,3 kb stromaufwärts der kodierenden Sequenz des *Dll1*-Gens in *cis*-regulatorische Elemente gegliedert, die eine Genexpression räumlich und zeitlich individuell steuern können. Die Expression im paraxialen Mesoderm hängt sowohl von positiven (zwei Regionen fungieren als neuronale und zwei Regionen als mesodermale

Enhancer) als auch von negativen (Region innerhalb des MSDI-Elements reprimiert MSDII) regulatorischen Elementen ab (Abbildung 15). Da bekannt ist, dass die Expression von *Dll1* in den Somiten auf die posterioren Kompartimente und die Myotome der sich differenzierenden Somiten begrenzt ist (Bettenhausen et al., 1995), die Expression des *Dll1*^{tg4.3/lacZ} aber in den ganzen Somiten erfolgt, muss es außerhalb des Bereichs der Promotorregion ein weiteres Element geben, welches die Expression von *Dll1* in den anterioren Somitenhälften reprimiert (Beckers et al., 2000).

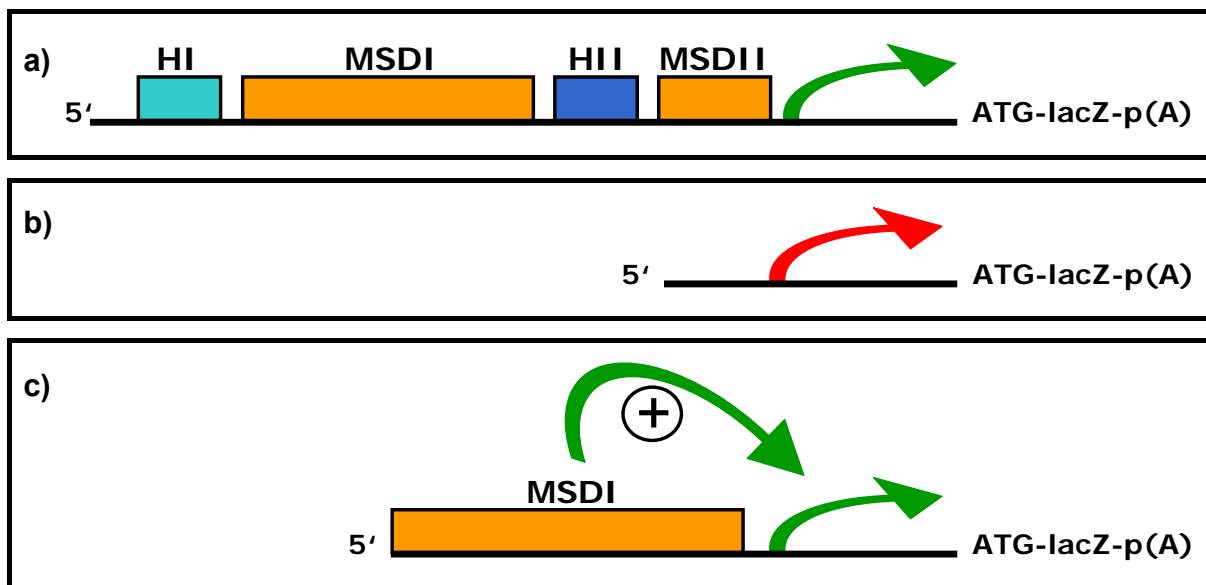


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Deletionsstudien zur Analyse von cis-regulatorischen Regionen innerhalb des *Dll1*-Promotors durch Analyse der Expression eines *LacZ*-Reportergens in transgenen Mäusen. a) Die *Dll1*-Promotorregion ist gekennzeichnet durch die beiden mesodermalen Enhancer MSDI (1500 bp) und MSDII (850 bp), die die Reportergenexpression im präsomitischen Mesoderm steuern. Das MSDII ist noch zusätzlich für eine schwache Expression von *Dll1* im ventralen Neuralrohr verantwortlich. Die neuronale Expression von *Dll1* wird durch die Homologieregionen HI und HII reguliert, HI = Homologieregion I, HII = Homologieregion II; b) der minimale Promotor ist nicht ausreichend, um eine mesodermale Expression von *Dll1* hervorzurufen (roter Pfeil); c) Das MSDI funktioniert als ein Enhancer und ist in Kombination mit dem Minimalpromotor für die Expression von *Dll1* im paraxialen Mesoderm verantwortlich (Beckers et al., 2000).

In einem Vorexperiment an transgenen Mäusen, in dem verschieden lange Teilfragmente des mesodermalen Enhancers (MSDI) eingesetzt wurden, zeigte sich, dass nur ein bestimmtes Fragment, MSDI-B (Abbildung 16), die Expression von *Dll1* ins Mesoderm lenken kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass mindestens zwei Sequenzbereiche innerhalb des Fragments MSDI-B für diese Expression verantwortlich sein müssen (Gossler A., persönliche Mitteilung).

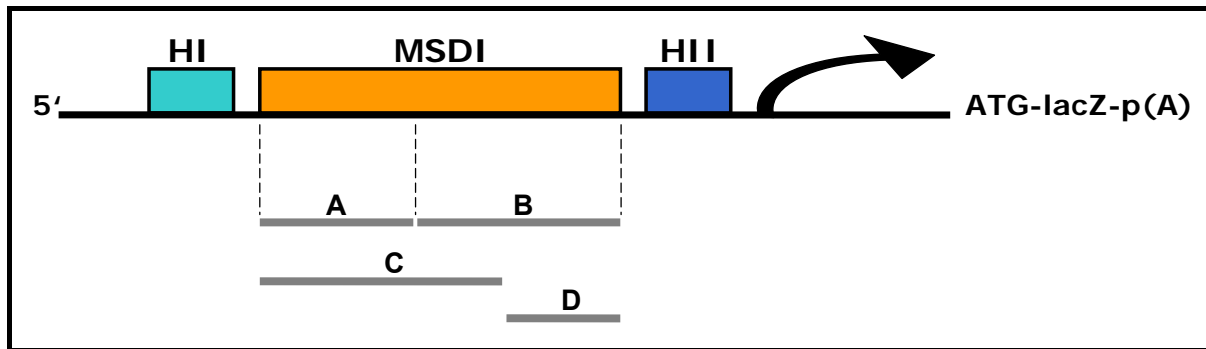


Abbildung 16: Mesodermaler Enhancer (MSDI) mit flankierenden Bereichen „HI“ und „HII“, die für die neuronale Expression von *Dll*-Gen verantwortlich sind. Nur das Teilfragment „B“ kann die Expression von *Dll* ins Mesoderm lenken.

Das Interesse in dieser Arbeit galt der weiteren Untersuchung des MSDI-B Fragments, um die mesodermale Expression von *Dll* genauer zu studieren.

Das mesodermale Enhancerfragment MSDI-B wurde für eine matrixgestützte *in silico*-Analyse verwendet, um nach möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu suchen. Es wurden zwei Sequenzbereiche identifiziert, ein in 5' liegendes Motiv mit vier putativen Bindestellen (*Pit1*, *Ecat*, *Myt1* und *Cmyb*) und ein 3' liegendes Motiv mit zwei putativen Bindestellen (*Ecat* und *Myt1*) für Transkriptionsfaktoren (GEMS-Launcher-Software (Genomatix), Zusammenarbeit mit Dr. T. Werner, GSF, Neuherberg). Beide Motive wurden ebenfalls im humanen *DLL1*-Gen, aber in einer umgekehrten Anordnung identifiziert. Die evolutionäre Konservierung dieser Transkriptionsfaktorbindestellen ist ein starkes Indiz für die funktionelle Bedeutung dieser reguliert wirkenden Elemente.

Zur Überprüfung deren Funktion *in vivo* wurden innerhalb dieser Arbeit die putativen Sequenzmotive mutiert und vor einem Minimalpromotor des *Dll*-Gens und dem Reportergen *LacZ* kloniert. Es wurden insgesamt vier Konstrukte hergestellt (Abbildung 17). Das Konstrukt (a), welches aus dem gesamten mesodermalen Enhancerfragment „B“ (MSDI-B) besteht, blieb unverändert. Konstrukt (b) hat eine Deletion des 5'-befindlichen Motivs, während im Konstrukt (c) das 3'-gelegene Motiv deletiert ist. Das Konstrukt (d) trägt sowohl die 5'- als auch die 3'-Deletion (Abbildung 17). Die Herstellung von transgenen Mäusen erfolgte durch Vorkerninjektion der Konstrukte in Mäusezygoten und der Implantation der manipulierten Zygoten in Ammenmäusen.

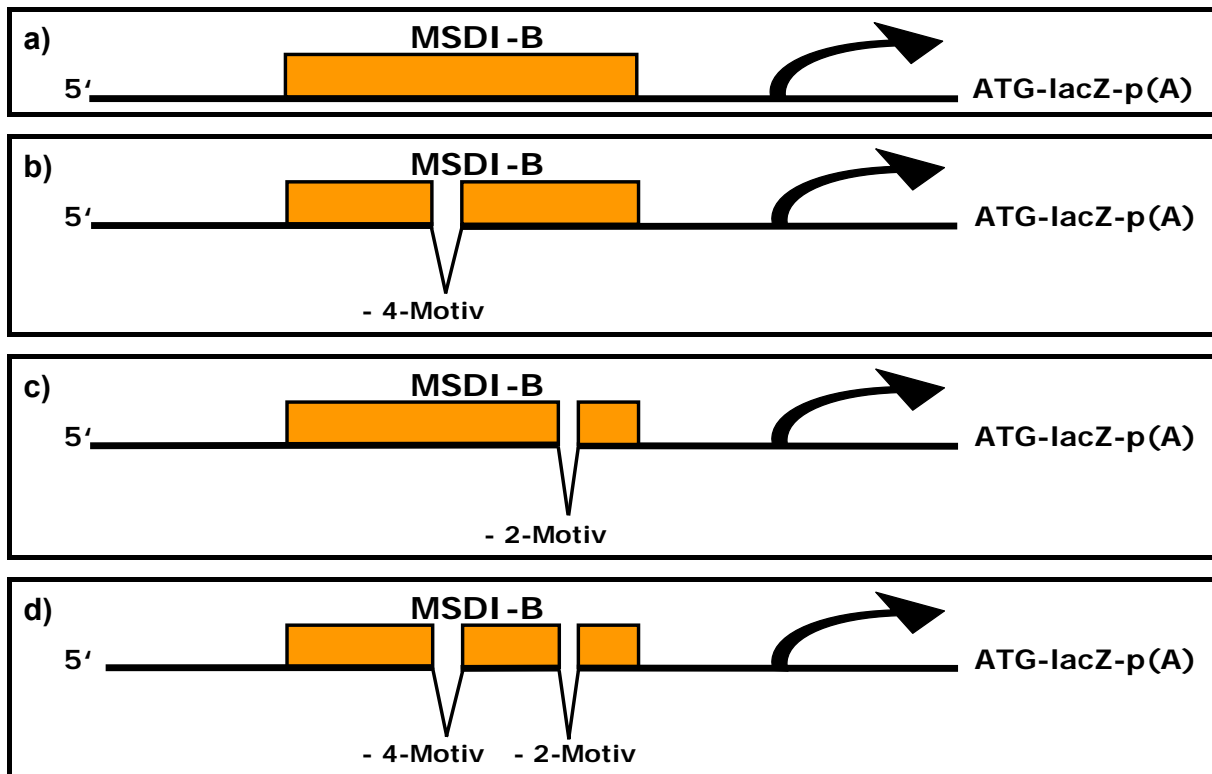


Abbildung 17: Konstruktaufbau mit im *in silico*-Verfahren identifizierten 2-er- und 4-er-Motiven für putative Transkriptionsfaktorbindestellen zur Erstellung transgener Mäuse. (a) Konstrukt, welches aus dem gesamten mesodermalen Enhancerfragment „B“ (MSDI-B) besteht; (b) Konstrukt mit einer Deletion des 5'-gelegenen Motivs; (c) Konstrukt mit einer Deletion des 3'-gelegenen Motivs; (d) Konstrukt trägt sowohl die 5'-als auch die 3'-Deletion. 4-er Motiv: *Pit1*, *Ecat*, *Myt1*, *Cmyb*; 2-er Motiv: *Ecat*, *Myt1*.

Die Klonierung von allen vier transgenen Konstrukten wurde innerhalb dieser Arbeit abgeschlossen. Die Verifizierung der zu verwendeten Konstrukte erfolgte über die Sequenzierung und den Restriktionsverdau mit anschließender Fragmentgrößenkontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 18).

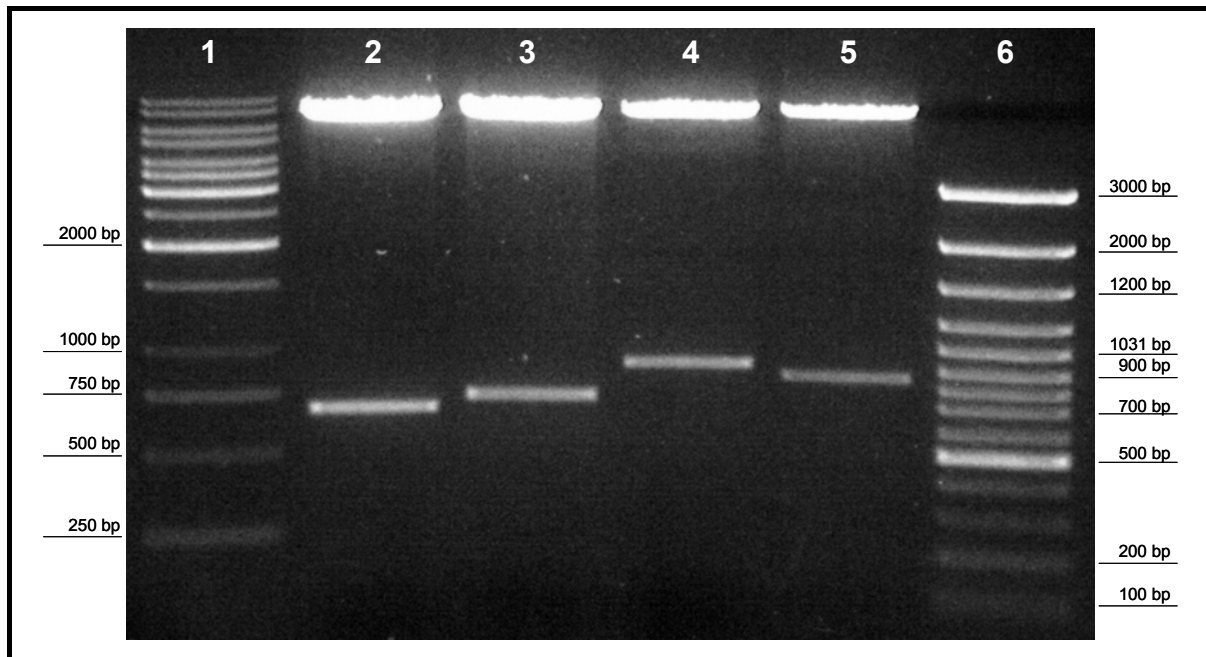


Abbildung 18: Größenkontrolle nach Restriktionsverdau (SpeI/XhoI) der vier modifizierten mesodermalen Enhancer-Konstrukte. Herausgeschnittene DNA-Sequenzen entsprechen dem modifizierten MSDI-B-Fragment. 1: 1kb-Längenstandard; 2: MSDI-B-2er/4er (606 bp); 3: MSDI-B-4er (670 bp); 4: MSDI-B (839 bp); 5: MSDI-B-2er (775 bp); 6: 100bp-Längenstandard.

Die Injektion der Konstrukte in befruchtete Eizellen wurde jeweils dreimal in unabhängigen Experimenten durchgeführt und in die Ammentiere übertragen. So wurden z. B. für das Konstrukt mit der Doppeldeletion (MSDI-B-2er/4er, Entfernung des 2-er- und 4-er-Motivs) drei Injektionsexperimente durchgeführt, die schließlich zur Geburt von 16 Mäusen führten, von denen wiederum 5 Tiere das Transgen eindeutig enthielten. Für die Konstrukte MSDI-B, MSDI-B-4er und MSDI-B-2er wurden 2, 5 und 3 Transgene Tiere erhalten. Die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde über zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen (Untersuchung auf Verkürzung der MSDI-Fragmente und auf Vorhandensein der LacZ-Sequenz; siehe Primer, Material und Methoden) durchgeführt. Das Verpaaren der transgenen Mäuse mit Wildtypmäusen führte stets zum Neugeborenen, welche zu 30-40 % die transgenen Allele trugen.

Die Analyse der erhaltenen transgenen Tiere durch z. B. LacZ-Färbung zum Nachweis der Expression des *DIII*-Transgens in Mausembryonen konnte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden.

DISKUSSION

A Die Analyse des Transkriptoms

Mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie wurde innerhalb dieser Arbeit untersucht, ob eine ausreichend umfangreiche und prinzipiell erfolgreiche Studie der Genexpression im Mausmodell möglich ist:

1. In Mausembryonen mit einem inaktivierten Gen:

Die RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp als Beispiel zur Identifikation neuer Gene des Delta-Notch-Signalwegs.

2. In Mausgehirnen mit einem gewebespezifisch inaktivierten Gen:

In diesem Fall wurde die RNA-Expressionsanalyse von Mausgehirnen (Tag 14 *p. p.*) mit gewebespezifisch ausgeschalteter *Thioredoxinreduktase 1* im Vergleich zu heterozygoten Tieren durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene nachweisen zu können.

3. In einem Gewebe zweier verschiedener Mausstämme:

In Zusammenarbeit mit der *German Mouse Clinic* (GMC) wurde die RNA-Expressionsanalyse als Teil einer Vielzahl von Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung von Mausstämmen (C3HeB/FeJ und C57BL/6J) angewandt, die als „genetischer Hintergrund“ für die Generierung von Mausmutanten dient.

4. In einem Gewebe der Maus, die mit einem Nahrungsergänzungsmittel supplementiert wird:

Hierfür wurde der Effekt der Zugabe der körpereigenen Substanz Creatin auf die Genexpression im Mausgehirn studiert

A.1 *RNA-Expressionsanalyse von Mausembryonen mit inaktiviertem Gen: Die Dll1-knock-out-Maus*

Um eine vergleichende Transkriptomanalyse am Beispiel eines Gewebes mit ausgeschaltetem Gen im Vergleich zum Wildtyp durchzuführen, wurde mit Hilfe einer RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-Embryonen Tag 11,5 *p. c.* des Genotyps *Dll1*^{LacZ/LacZ} versus *Dll1*^{+/+} hergestellt.

Insgesamt lieferte die vergleichende Transkriptomanalyse 63 signifikant regulierte Gene (32 hoch-regulierte, 31 runter-regulierte in *Dll1-knock-out*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp).

Von diesen Kandidatengen wurden zufällig 5 der in der DNA-Chipanalyse hoch-regulierten Gene für eine RT-PCR und 27 am stärksten differentiell exprimierten Gene (18 hoch-regulierte, 9 runter-regulierte) für eine Echtzeit-PCR (TaqMan) zur Verifikation ausgewählt. Für alle ausgewählten Gene konnte die differentielle Expression zu 100 % bestätigt werden. Dieses Resultat unterstreicht die hohe Verlässlichkeit der durch die RNA-Expressionsanalyse erhaltenen Ergebnisse. Zu beachten ist dabei, dass die RT-PCR-Analyse lediglich die Tendenz der Genexpressionsverhältnisse aufzeigen kann. Abhilfe würde eine Standardkurve schaffen, die mit bekannten Quantitäten erstellt werden müsste. Ein derartiger Aufwand würde dem Ergebnis nicht gerecht werden, da andere Methoden, wie die Echtzeit-PCR, wesentlich genauere Quantifizierungen liefern.

Die Echtzeit-PCR wurde für 7 der zuvor verifizierten Gene mit einer zweiten Apparatur wiederholt, welche die differentielle Expression dieser Gene ebenfalls zu 100 % bestätigen konnte. Allerdings haben die Ergebnisse der beiden Echtzeit-PCR-Methoden (LightCycler und TaqMan) sich hinsichtlich der ermittelten Expressionsverhältnisse und ihrer Genauigkeit unterschieden, ermittelt über den Vergleich der beiden verwendeten Primerpaare für jedes Gen. Im Vergleich zum TaqMan-Verfahren konnten mit der LightCycler-Methode insgesamt bei 6 von 7 untersuchten Genen geringere Genexpressionsverhältnisse ermittelt werden. Allerdings waren die Standardabweichungen der beiden Primerpaare bei 5 von 7 untersuchten Genen geringer. Daraus kann geschlossen werden, dass die Verwendung der LightCycler-Apparatur genauere Ergebnisse lieferte.

An Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen zeigte sich, dass die 15 zufällig ausgewählten Gene aus den am stärksten hoch-regulierten in der DNA-Chipanalyse auch in Wildtypen am Tag 11,5 *p. c.* exprimiert wurden. Das Ergebnis bestätigte nochmals die Resultate der DNA-Chipanalyse.

Die Expressionen der Kandidatengene, die mit dem Expressionsmuster von *Dll1* überlappten, ließen vermuten, dass diese Gene mit *Dll1* bzw. mit dem Verlust der *Dll1*-Aktivität in *Dll1*-defizienten Mäusen in einem funktionellen Zusammenhang stehen könnten. Sowohl zwischen den Kandidatengen und *Dll1* als auch zwischen den einzelnen Kandidatengen selbst konnte zunächst keine Verbindung in der Fachliteratur hergestellt werden. An dieser Stelle kam die Software *Bibliosphere* (Genomatix; <http://www.genomatix.de>) zum Einsatz. Es handelt sich hierbei um eine interaktive Software, die alle relevanten Daten zu den gesuchten Genen aus Literaturdatenbanken und genomumfassenden Promotoranalysen erfasst, um alle möglichen Verbindungen zwischen diesen Genen zu extrahieren und zu analysieren (Co-

Zitierungsanalyse). Dabei kann *Bibliosphere* auf über 12 Millionen Zusammenfassungen aus wissenschaftlichen Artikeln von *Pubmed* (NCBI) zugreifen.

Mit Hilfe der Software *Bibliosphere* zeigte sich in der Analyse, dass fünf verifizierte Kandidatengene (von insgesamt 27) (*Ndrgl*, Rang 1; *P4hb*, Rang 2; *Aldo1*, Rang 4 und 6 (zwei Proben); *Hig1*, Rang 8 und *Gpi1*, Rang 15 (Rangordnung laut Ergebnisse DNA-Chipanalyse) sowie ein weiteres nicht-verifiziertes Kandidatengen *Gas5* (Rang 24) an der Ausbildung der neuronalen Hypoxia beteiligt sind (Jin et al., 2002) (Abbildung 19).

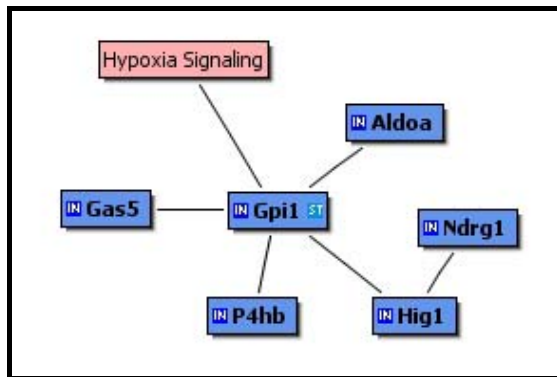


Abbildung 19: Ergebnis der Co-Zitierungsanalyse (Bibliosphere, Genomatix) von hoch-regulierten Kandidatengenen aus RNA-Expressionsanalyse von *Dll1*-defizienten Mausembryonen. Die Gene *Ndrgl*, *P4hb*, *Aldo1*, *Hig1*, *Gpi1* und *Gas5* an dem Hypoxia-Signalweg beteiligt.

Bei Hypoxia handelt es sich im Allgemeinen um einen Sauerstoffmangel in den Geweben eines Organismus. Im Speziellen ist die neuronale Hypoxia ein pathogener Bestandteil der cerebralen Ischemia (Blutleere), die das Sterben von neuronalen Zellen im Gehirn zur Folge hat und das erste neuropathologische Merkmal eines Schlaganfalls ist. Jin et al. fanden in cDNA-Microarray-Experimenten heraus, dass diese Kandidaten zu den Genen gehören, die in kultivierten cerebralen und kortikalen Neuronen der Maus, die für 24 Stunden einem Sauerstoffmangel ausgesetzt war, am stärksten hoch-reguliert wurden (insgesamt wurden 26 bekannte Gene hoch-reguliert) (Jin et al., 2002). Dabei kodiert das Gen *P4hb* (*proline 4-hydroxylase*) für das Enzym Disulfid-Isomerase/Oxireduktase, welches im Endoplasmatischen Retikulum exprimiert ist und eine Rolle bei der Ubiquitinierung von Proteinen spielt. Von den Genen *Gpi1* (*glucose phosphate isomerase 1*), *Aldo1* (*aldolase 1*) und *Hig1* (*Hypoxia induced gene 1*) ist bereits bekannt, dass sie auch in nicht-neuralem Gewebe durch Hypoxia induziert werden können. Beispielsweise wurde *Gpi1*, welches die gegenseitige Umwandlung von Glucose-6-phosphat und Fruktose-6-phosphat im glykolytischen Embden-Meyerhof Weg katalysiert, als ein durch Hypoxia induzierbares Gen in Bauchspeicheldrüsenkrebs-Zellen identifiziert (Yoon et al., 2001). *Aldo1* ist ein durch Hypoxia induziertes und von HIF-1 reguliertes Gen (Semenza et al., 1996), welches einen Teil der glykolytischen Antwort auf Hypoxia oder Ischemia ausmacht. *Gas5* gehört zur

Familie der Tumorsuppressorgene, welche über Rb oder p53 agieren können (Del Sal et al., 1992). Die Funktion des erst kürzlich identifizierten Gens *Hig1* ist bislang noch unerforscht. Hingegen spielt *NdrG1* eine Rolle beim Zellwachstum und bei der Differenzierung von Zellen des peripheren Nervensystems und ist mutiert im Lom-Typ der vererbaren Krankheit sensorischer und motorischer Nerven (Kalaydjieva et al., 2000). Es wird vermutet, dass dieses Gen Apoptose fördern kann (Jin et al., 1999). Außerdem ist bekannt, dass die Expression von *NdrG1* (*N-myc downstream regulated gene 1*) durch *N-myc* in der Maus reprimiert wird (Shimono et al., 1999). Die Funktion der einzelnen Gene *NdrG1*, *P4hb*, *Aldo1*, *Hig1*, *Gpi1* und *Gas5* unterstreicht somit die Bedeutung der durch das Endoplasmatische Retikulum vermittelten Apoptose und der Ubiquitinierung von Proteinen infolge eines Sauerstoffmangels des neuronalen Gewebes. Eine direkte funktionelle Verbindung zwischen den Kandidatengenen und *Dll1* bzw. einer durch Sauerstoffmangel induzierten Hoch-regulierung dieser Kandidatengene in *Dll1*-defizienten Mäusen konnte aber auch auf diese Weise nicht hergestellt werden. Dennoch ist bekannt, dass die Embryonen von homozygoten *Dll1*-defizienten Mäusen am Tag 11,5 - 12,5 *p. c.* sterben und daher durchaus apoptotische Prozesse ablaufen. Folglich verwundert es nicht, dass im untersuchten Stadium Tag 11,5 *p. c.* diese Gene in *Dll1*-defizienten Mäusen hoch-reguliert sind. Demnach ist die Hoch-Regulation dieser 6 Gene vermutlich als sekundärer Effekt der *Dll1*-Defizienz zu sehen.

Möglicherweise ist genau dieser Effekt dafür verantwortlich, dass die bekannten Zielgene von *Dll1* in ihrer differentiellen Expressionsstärke in Relation niedriger waren und nicht in der DNA-Chipanalyse detektiert werden konnten. Zusätzlich wurden für die RNA-Expressionsanalyse ganze Embryonen verwendet, womit der Einfluss auf die Detektion von differentieller Expression in distinkten Geweben verstärkt wird. Auf der anderen Seite müssen Gene, die am Delta/Notch-Signalweg beteiligt sind nicht zwingend am stärksten differentiell exprimiert zwischen *Dll1*-Mutante und Wildtyp sein.

Trotz der Annahme, dass möglicherweise nur sekundäre Effekte der *Dll1*-Defizienz detektiert werden können, ist die Durchführung der Transkriptomanalyse berechtigt, da frühere RNA-Expressionsanalysen an jüngeren Embryonen (10,5 *p. c.*) einen sehr geringen Grad der differentiellen Geregulation unter den Kandidatengenen hatten (Machka et al., 2005).

Um feststellen zu können, wie die Expressionsmuster der hoch-regulierten Kandidatengene in *Dll1-knock-out* homozygoten Mausembryonen aussehen, wären folglich Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an solchen Embryonen durchzuführen. Allerdings ist die Gewinnung der Embryonen für diese *in vitro*-Experimente stark limitiert, da Mäuse des Genotyps

Dll1^{LacZ/LacZ}, wie oben beschrieben, letal sind. Daher müssen heterozygote Mäuse miteinander verpaart werden, um homozygote Embryonen zu erhalten. Die Zahl der durch diese Verpaarungen erhaltenen homozygoten Tiere im Alter von Tag 11,5 *p. c.* ist weit unter den normalerweise erwarteten 25 %, da die Embryonen zu diesem Zeitpunkt schon vereinzelt verstorben sind. Außerdem bringen Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an den teilweise morphologisch veränderten Tieren zum Untersuchungszeitpunkt von Tag 11,5 *p. c.* nicht den gewünschten Erfolg. Die Embryonen sind undurchsichtig oder zum Teil resorbiert. Alternativ wäre es möglich gewesen, heterozygote, lebensfähige *Dll1*-Embryonen zu verwenden. Die auf diese Weise erhaltenen Expressionsergebnisse wären aber nicht mit den Ergebnissen der RNA-Expressionsprofilanalyse vergleichbar gewesen, da für diese Analysen homozygote Mausembryonen verwendet wurden.

A.2 RNA-Expressionsanalyse von Mausgehirnen mit gewebespezifisch inaktiviertem Gen: Die Thioredoxinreduktase 1-knock-out-Maus

Das Thioredoxin-Redox-System ist eines der bedeutendsten Redox-Systeme in tierischen Zellen, welches aktiv die intrazelluläre Redox-Umgebung reguliert (Holmgren, 1985) und in einer Vielzahl von biochemischen Prozessen, wie Zellteilung und Zelltod, involviert ist. Mäuse mit einem gewebespezifischen, auf neuronale Vorläuferzellen (Nestin-positive Zellen) beschränkten, konditionalen *Txnrd1*-*knock-out* zeigten Ataxie und cerebellare Hypoplasie (Jakupoglu et al., 2005). Um Unterschiede in der Genexpression zwischen diesen Tieren und wildtypischen Mäusen aufzuzeigen, wurde eine RNA-Expressionsprofilanalyse erstellt.

Das in der Mutante mit dem höchsten Faktor runter-regulierte Gen, ermittelt anhand des minimalen Expressionsquotienten in allen 10 Hybridisierungsexperimenten, ist das ausgeschaltete Gen *Txnrd1* selbst ($1,87 \pm 0,61$). Der relativ niedrige Expressionsquotient von *Txnrd1* ist vermutlich auf die Verwendung einer gewebespezifischen *Txnrd1*-Mausmutante zurückzuführen. Das hat zur Folge, dass die Transkription des Gens nicht in jeder Zelle blockiert ist. Darüber hinaus konnten zwei weitere runter-regulierte bislang noch unbekannte Gene identifiziert werden.

Um einen besseren Überblick über die differentiell exprimierten Gene zu erhalten, wurden jeweils drei (von zehn) Signale mit der am geringsten gemessenen Intensität für jede DNA-Chipprobe aus der RNA-Expressionsprofilanalyse ausgeschlossen. So wurden insgesamt 15 differentiell exprimierte Gene erhalten, davon 3 hoch-reguliert und 12 runter-reguliert.

Auf diese Weise wurde das runter-regulierte Gen *Zic1* (*zink finger of cerebellum 1*; $1,74 \pm 0,42$) detektiert, welches zur Familie der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren gehört und im Cerebellum exprimiert wird (Aruga et al., 1994; Cho et al., 2003; Nagai et al., 1997). Ein weiteres Mitglied dieser Familie stellt *Zic2* dar. *Zic1* und *Zic2* weisen überlappende Expressionsmuster auf und sind für die Entwicklung des Cerebellums erforderlich, indem sie die neuronale Differenzierung regulieren (Aruga et al., 2002a; Aruga et al., 2002b). Das Hybridisierungssignal von *Zic2* war jedoch nicht stark genug, um die cDNA-Probe in den RNA-Expressionsprofilen zu detektieren. Ähnlich wie *Txnrd1*-defiziente Mäuse sind homozygote *Zic1*-Mutanten kleiner und leichter als ihre wildtypischen Artgenossen und zeigen außerdem eine cerebellare Hypoplasie. Mehr als die Hälfte der Tiere starben bereits am Tag ihrer Geburt, die meisten anderen innerhalb der ersten 3 Lebenswochen (Aruga et al., 2002a). Die wenigen Mäuse, die älter als 3 Wochen wurden, hatten die gleichen Symptome wie *Txnrd1*-überlebende Tiere (z. B. Zittern und Ataxie). Dieses Wissen und die Tatsache, dass die gehirnspezifischen Gene *Zic1* und *Txnrd1* nicht nur in den gleichen Geweben exprimiert, sondern auch ähnlich reguliert werden, lassen vermuten, dass zwischen beiden Genen ein funktioneller Zusammenhang besteht. Um eine funktionelle Verbindung zwischen den Genen aufzeigen zu können, sind weitere Analysen notwendig.

Wie das cytosolische Enzym *Txnrd1* ist auch das mitochondriale Enzym *Txnrd2* im Cerebellum exprimiert. Ergebnisse von funktionellen Analysen verschiedener Forschergruppen deuten auf eine ähnliche Funktion dieser Gene in verschiedenen subzellulären Bereichen hin (Kawai et al., 2000; Spyrou et al., 1997). Dass *Txnrd1* mit *Txnrd2* in einem funktionellen Zusammenhang steht ist daher eher unwahrscheinlich. Im Fall der mit *Txnrd1*-verwandten *Thioredoxinreduktasen 2* und *3* (Hazel et al., 1988; Kawai et al., 2000) zeigte die Auswertung der RNA-Expressionsprofilanalyse keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der Genregulation.

Angiotensinogen (*Agt*) stellt ein weiteres Kandidatengen dar (Abel et al. 1986), welches ebenfalls in der DNA-Chipanalyse $1,77 \pm 0,66$ -fach hoch-reguliert war. *Agt* ist beispielsweise im Cerebellum und der *Medulla oblongata* als auch in den Venen und in der Aorta exprimiert. Verschiedene *knock-out*-Modelle hinsichtlich des Renin-Angiotensinogen-Systems (RAS) konnten zeigen, dass das Gen während der Blutdruckkontrolle eine Schlüsselrolle spielt (Esther et al., 1996). *Agt* wird in Astrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS) (Kakinuma et al., 1998) und in Neuronen (Milsted et al., 1990) exprimiert. Es konnte bewiesen werden, dass *Agt* eine physiologisch bedeutende Rolle bei der Antwort auf Gehirnverletzungen spielt (Fukamizu, 1999), eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der Gehirn-Blut-Schranke

übernimmt (Kakinuma et al., 1998) und neuronale Zellen vor Apoptose schützt (Kakinuma et al., 1997). In weiteren Experimenten ist die Frage zu beantworten, warum *Agt* in der DNA-Chipanalyse differentiell hoch-reguliert war und ob *Agt* und *Txnrd1* sich gegenseitig regulieren oder einer gemeinsamen funktionellen Regulation unterliegen.

Momentan werden die Daten der RNA-Expressionsprofilanalyse verifiziert und die funktionellen Zusammenhänge zwischen weiteren Kandidatengenen, zum Teil noch unbekannten Genen und *Txnrd1* von unserem Kollaborationspartner (Prof. Schmidt, AVM, GSF, Neuherberg), die auch die *Txnrd1*-defizienten Mäuse und die Kontrolltiere zur Verfügung gestellt hat, weiter analysiert. Anhand funktioneller Studien können weitere funktionelle Zusammenhänge zwischen diesen Genen und *Txnrd1* festgestellt werden. Die Veröffentlichung der erhaltenen Ergebnisse ist in Vorbereitung.

A.3 RNA-Expressionsanalyse vom Gewebe zweier Mausstämme, anhand des Vergleichs des Thymus der Mausstämme C3HeB/FeJ und C57BL/6J

In Zusammenarbeit mit der *German Mouse Clinic* (GMC) wurde eine RNA-Expressionsanalyse als Teil einer Vielzahl von Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung zweier Mausstämme, C3HeB/FeJ (C3H) und C57BL/6J (B6), angewandt, die als „genetischer Hintergrund“ für die Generierung von Mausmutanten eingesetzt werden. Die Ergebnisse sollen umfassende standardisierte Phänotypisierungen von Mausmutantenlinien im Rahmen der GMC ermöglichen und erleichtern.

Für die RNA-Expressionsprofilanalyse wurde das Thymus-Gewebe der untersuchten Mausstämme eingesetzt. Dieses Organ wurde aufgrund der pathologischen Unterschiede beider Mausstämme verwendet. Es zeigte sich, dass der Thymus von C3H Mäusen im Vergleich zu B6 deutlich größer war. Außerdem konnte festgestellt werden, dass C3H Mäuse weniger sensitiv als B6 auf die Reduzierung von Nahrungsmitteln (Energiemetabolismus Screen) reagierten. Letztere entwickelten eine Woche nach Beginn einer Reduktionsdiät eine Thymusatrophie, was andere Studien bestätigen (Barone et al., 1993). Diese charakteristischen Stammmerkmale unterscheiden C3H und B6 von einander und führten zur Auswahl des Thymus für die RNA-Expressionsanalyse.

In der RNA-Expressionsanalyse konnte eine Vielzahl von differentiell exprimierten Genen detektiert werden, was auf das Vorhandensein von signifikanten molekularen Unterschieden zwischen den Mausstämmen C3H und B6 schließen lässt. Unter den 22 signifikant differentiell exprimierten Genen befindet sich unter anderem das am stärksten in C3H mit dem Faktor $5,53 \pm 1,46$ hoch-regulierte Gen *Lymphozyten Antigen 6 Komplex-Gen* (*Ly6d*). *Ly6d* wird exklusiv in B-Zellen des Thymus und der Milz exprimiert (Sandrin et al., 2000), wo es in Zelladhäsionsvorgängen involviert ist. Die *Ly6d*-regulierte Expression ist für die T-Zellen-Entwicklung erforderlich, wo es die endotheliale Adhäsion und die Zielwanderung von CD8⁺ T-Zellen durch die Aktivierung des Integrin-abhängigen Adhäsionssignalwegs reguliert (Hanninen et al., 1997). Der Immunologiescreen von GMC zeigte, dass in C3H Mäusen die Anzahl von CD8⁺ Zellen im Blut ($10,91 \pm 0,15$) im Vergleich zu B6 Mäusen ($7,78 \pm 0,21$) bedeutend höher war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Ly6d* möglicherweise einen der Faktoren darstellt, der für die molekularen Unterschiede zwischen den Stämmen verantwortlich ist.

Als ein weiteres Beispiel für die Relevanz der identifizierten Kandidaten in der DNA-Chipanalyse ist die Serin Protease *Prss16* zu nennen, die im Epithel, im Cortex des Thymus exprimiert ist. *Prss16* war in der RNA-Expressionsprofilanalyse $1,7 \pm 0,28$ (Rang 7 unter den hoch-regulierten Genen) in C3H im Vergleich zu B6 hoch-reguliert. *Prss16* scheint aufgrund seines Expressionsmusters eine positive Rolle bei der Auswahl von T-Zellen zu spielen. Abnormale Veränderungen in der positiven Selektion von T-Zellen, von CD4⁺ im Speziellen, wurden mit der Pathogenese von Diabetes in Verbindung gebracht (Brenden and Bohme, 1999; Georgiou et al., 1995a; Georgiou et al., 1995b; Georgiou and Mandel, 1995; Thomas-Vaslin et al., 1997). Weitere Analysen des klinisch-chemischen Screens von GMC zeigten, dass C3H-Mäuse nicht nur größer und schwerer als ihre B6-Artgenossen sind, sondern außerdem einen erhöhten Blutzuckerspiegel und zusätzlich eine vermehrte Anzahl von Triglyceriden und Cholesterol im Serum aufweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass, wie auch im Menschen, die anomale Expression von *Prss16* mit einem erhöhten Risiko an Diabetes zu erkranken, assoziiert ist.

Anhand dieser Beispiele konnte gezeigt werden, dass sich die spezifischen phänotypischen Charakteristiken und Unterschiede zwischen den Mausstämmen C3H und B6 auch in den Ergebnissen der RNA-Expressionsprofilanalyse widerspiegeln. Diese Ergebnisse stellen demnach eine Ergänzung zu den Analysen der anderen Forschergruppen der GMC dar.

Die innerhalb der Expressionsprofilanalyse gewonnenen Daten wurden mit den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen zusammengefasst. Sie werden in Kürze in einer Publikation mit dem Thema der vergleichenden, standardisierten Phänotypisierung von Mausmutanten in der *German Mouse Clinic* bei einem wissenschaftlichen Magazin eingereicht.

A.4 RNA-Expressionsanalyse von Gehirnen mit Creatin behandelte Mäuse

Bislang konnte aufgezeigt werden, dass die Reduktion von Kalorien die Lebensdauer von Labormäusen verlängert. In dieser groß angelegten Studie wurde ein ähnlicher, durch Creatin-vermittelter lebensverlängernder Effekt von circa 10 % festgestellt (Dr. A. Bender, PD Dr. T. Klopstock). Dieser Effekt wäre wahrscheinlich noch deutlicher ausgefallen, wenn die Creatin-Behandlung zu einem früheren Zeitpunkt (<1 Jahr) im Lebenszyklus der Maus stattgefunden hätte. Prinzipiell kann Creatin seinen Einfluss über verschiedene Mechanismen ausüben: als (1) Energiedonor, (2) anti-apoptotischer Effekt, (3) anti-oxidativer Effekt und (4) anti-excitotoxischer Effekt.

In Zusammenhang mit dieser Studie wurde eine RNA-Expressionsanalyse an Mausgehirnen mit dem Ziel durchgeführt, Unterschiede in der Genexpression zwischen den mit Creatin-behandelten (Creatin als Nahrungssupplementation) und unbehandelten Mäusen festzustellen. Dabei stellte sich heraus, dass kein signifikant differentiell exprimiertes Gen in allen durchgeführten DNA-Chip-Hybridisierungen identifiziert werden konnte. Zwar konnten differentiell exprimierte Gene in einzelnen DNA-Chips identifiziert werden, diese waren aber nicht in allen DNA-Chips reproduzierbar.

Grund hierfür könnte zum einen die nach der Isolierung aus den jeweiligen Mausgehirnen geringe Menge bzw. Qualität der zur Verfügung stehenden RNA sein. Anstatt geplanten 10 Hybridisierungsexperimenten konnten so nur 7 durchgeführt werden, die allesamt relativ schwache Expressionen zeigten. Andererseits könnten die Veränderungen auf der Ebene der RNA-Expression durch die Supplementierung von Creatin zur Nahrung so gering sein, dass sie mit diesem experimentellen Ansatz nicht nachweisbar sind. Die für die RNA-Expressionsanalyse eingesetzten RNAs aus Gehirnen unbehandelter Mäuse wurden zu einem Pool vereinigt. Die Erstellung eines Pools war aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden RNA-Menge notwendig. Dieses Vorgehen hat einen großen Nachteil, denn möglicherweise ist der Einfluss der biologischen Variabilität innerhalb der unbehandelten Tiere größer als derjenige, der durch die Cr-Supplementierung entstanden ist, was zur einer

Verfälschung der RNA-Expressionsdaten führen kann. Für solche geringen Transkriptomveränderungen, wie für diese Nahrungsmittelsupplementierung angenommen werden kann, eignet sich die Erstellung von Hybridisierungen einzelner Tiere besser (ohne RNA-Pools), da in der Auswertung die biologische Variabilität berücksichtigt werden kann (Seltmann et al., 2005).

Des Weiteren wurden die Tiere über einen Zeitraum von einem Jahr und ab einem Alter von 12 Monaten mit Creatin behandelt. Möglicherweise muss die Cr-Supplementierung in höheren Dosen als 1 % erfolgen bzw. muss die Verabreichung von Creatin schon zu einem früheren Zeitpunkt (<1 Jahr) in der Entwicklung der Maus beginnen.

A.5 Einfluss auf die DNA-Chipanalyse

Die Zuverlässigkeit der DNA-Chipanalyse ist im hohen Maße von verschiedenen Punkten abhängig, beispielsweise von der DNA-Chipherstellung und Hybridisierung (Drobyshev et al., 2003a; Drobyshev et al., 2003b), vom verwendeten biologischen Material, dem RNA-Isolierungsprotokoll, von der RNA-Qualität und der Qualität der Farbmarkierungsreaktion. Daher wurden innerhalb dieser Arbeit für jede biologische Fragestellung DNA-Chips des gleichen Sets, somit vergleichbarer Qualität, gewählt und für die Isolierung von RNA bzw. für die Farbmarkierungsreaktion ein standardisiertes Protokoll verwendet (siehe Material und Methoden).

Um den Einfluss der biologischen Variabilität so gering wie möglich zu halten, wurden Mäuse verwendet, die unter gleichen Bedingungen aufgezogen wurden. Um die Einwirkung der „Inneren Uhr“ des Organismus auf die Genexpression zu minimieren, wurden für alle Transkriptomanalysen die zu untersuchenden Mäuse zwischen 9 und 12 Uhr mit Kohlendioxid abgetötet. Um den Abbau von RNA so gering wie möglich zu halten, wurden die Gewebeproben nach der Entnahme und anschließendem Wiegen sofort eingefroren und bis zur RNA- und Proteinisolierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C aufbewahrt, während die isolierte RNA bei -80 °C gelagert wurde. Außerdem wurde vor jeder RNA-Expressionsanalyse die isolierte Gesamt-RNA auf Quantität und Qualität untersucht. Darüber hinaus wurde die Qualität der Ergebnisse, die mit den DNA-Chipanalysen erhalten wurden, an verschiedenen Stellen während des kompletten Analyseprozesses kontrolliert. Die Ermittlung der Rangfolge differentiell exprimierter Gene und die Auswahl der Kandidatengene erfolgten unter stringenten statischen Bedingungen. Die Ermittlung von qualitativ hochwertigen Analyseergebnissen setzt die Durchführung von Wiederholungsexperimenten (Lee et al., 2000) und das Vorhandensein von Klon-

Wiederholungen auf den DNA-Chips voraus (Lee et al., 2000; Tseng et al., 2001). Die Arbeitsgruppe Beckers entwickelte außerdem die Methode SAFE (*Specificity Assessment from Fractionation Experiments*), um eine hohe Qualität der RNA-Expressionsdaten gewährleisten zu können (Drobyshev et al., 2003b). Außerdem wurden an einem Beispiel (*Dll1*-defiziente Mäuse versus Wildtyp) die Ergebnisse der RNA-Expressionprofilanalysen ausführlich mittels RT-PCR und Echtzeit-PCR bestätigt.

A.6 DNA-Chiptechnologie als Methode Transkriptome darzustellen

Zusammenfassend konnte in den verschiedenen biologischen Anwendungen der Transkriptomanalyse gezeigt werden, dass die DNA-Chiptechnologie sehr gut für solche Analysen im Mausmodell geeignet ist. So konnte anhand der *Dll1*-knock-out-Mutante durch Verifikationen mittels RT-PCR und Echtzeit-PCR das Ergebnis der RNA-Expressionsprofilanalyse für die untersuchten Kandidaten zu 100 % bestätigt und beispielsweise eine Gruppe von sechs Genen identifiziert werden, die wahrscheinlich an einem gemeinsamen biologischen Prozess (Hypoxia) beteiligt sind. Ein weiteres Beispiel, wie die gewebespezifische Inaktivierung von *Thioredoxinreduktase 1* zeigte, dass die identifizierten differentiell exprimierten Gene *Zic1* und *Agt* in einem sehr engen biologischen Zusammenhang mit der Deletion dieses Gens im Cerebellum stehen. Und auch die gewonnenen RNA-Expressionsdaten aus dem Vergleich zweier Mausstämme konnten die in pathologischer Untersuchung detektierten Unterschiede zwischen diesen Mausstämmen bestätigen. Die Grenzen der Sensitivität der DNA-Chipanalyse konnten anhand der Creatin-Supplementierung aufgezeigt werden, da die Veränderungen des Transkriptoms im Gehirn der mit Creatin behandelten Tiere offensichtlich zu gering waren, so dass sie von dem Einfluss der biologischen Variabilität unter den gepoolten RNAs aus Gehirnen unbehandelter Tiere verfälscht wurden. Durch das Vermeiden von RNA-Pools kann allerdings die Sensitivität dieser Analyse gesteigert werden.

B Vergleichende Analyse des Transkriptoms und Proteoms von Leber und Niere in der Maus

Unter Verwendung der auf DNA-Chip-basierenden RNA-Expressionsanalyse mit über 20.000 Proben konnten mit hoher statistischer Signifikanz mehr als 1.800 differentiell regulierte Transkripte zwischen Leber und Niere der Maus identifizieren werden. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese wurden in jedem Gewebe ungefähr 2.300 Spots nachgewiesen. Über 800 Spots waren mit einem Faktor von mindestens 1,5 differentiell reguliert. Die Proteinmassenspektroskopische Analyse (MFP) von 47 isolierten Spots führte zur Identifikation von 43 verschiedenen differentiellen Proteinen. Diese vergleichenden Genexpressionsdaten wurden als eine Art „Tool“ verwendet, um (1) die Funktion von differentiellen Transkripten und Proteinen zu beurteilen und (2) transkriptionelle und *post*-transkriptionelle Regulation miteinander in Beziehung zu bringen.

B.1 Funktionen von Transkripten und Proteinen

Der Vergleich der funktionellen Kommentierung der bedeutendsten differentiellen Proteine und Transkripte deutet darauf hin, dass Methoden zur Detektion von Proteinen und Transkripten funktionelle Klassen mit verschiedenen Präferenzen offenbaren. Die metabolischen Enzyme bilden die größte Fraktion der identifizierten Proteine. Ein kleinerer Anteil ist mit anderen Funktionen wie Transport oder Struktur assoziiert. Diese Beobachtungen werden durch ähnliche Entdeckungen bestätigt, die sich zum Beispiel bei der Analyse des Proteoms des Gehirns der Maus ergeben haben (Gauss et al., 1999; Tsugita et al., 2000). Im Gegensatz dazu zeigen differentielle Transkripte eine größere Anzahl von diversen Funktionen (Ergebnisse, Abbildung 12). Diese relativ geringe Anzahl von diversen funktionellen Gruppen auf Proteinebene kommt durch die Limitierung der Proteomanalysemethode zustande. Die Nachweisgrenze der Proteomanalysemethode wurde mit mindestens 1000 Kopien eines Proteins pro Zelle abgeschätzt. Die Proteine, die mittels 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen wurden, repräsentieren die am meisten regulierten Proteine der analysierten Gewebe. Zusätzlich wurden die stärksten differentiellen Spots der 2D-Gele für die Proteinidentifizierung ausgewählt. Diese experimentelle Limitierung ist möglicherweise ein bedeutender Grund dafür, dass die meisten der detektierten Proteine metabolische Funktionen haben.

Folglich scheint, in Hinblick auf die Unterschiede in der Proteinexpression, das größte Unterscheidungsmerkmal zwischen Leber- und Nierenzellen das Set an metabolischen

Enzymen zu sein, welches in den entsprechenden Geweben aktiviert wird. Die Tatsache, dass die DNA-Chipexpressionsprofilanalyse sensitiver ist, könnte ein Grund dafür liefern, dass die differentiellen Transkripte vielfältigere Funktionen haben. Letztere umfassen 22 % in der Leber und 36 % in der Niere vorkommende unbekannte Gene und Gene ohne funktionelle Annotation. Somit könnte die auf DNA-Chip-basierende Transkriptomanalyse auch eine effiziente Methode zur Identifizierung von neuen, mit Erkrankungen assoziierten Genen darstellen (Dhanasekaran et al., 2001; Su et al., 2001).

Im Gegensatz dazu befanden sich unter den identifizierten Proteinen 8 % in der Leber und 0 % in der Niere, die keine funktionellen Annotierungen hatten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Identifizierung von neuen Genen und von Genen ohne funktionelle Beschreibung, Transkriptomanalysen im Vergleich zu Proteomanalysen (mittels 2D-Gelelektrophorese und Massenspektroskopie) effizienter sind. Diese Aussage ist zumindest für die Gewebe von Leber und Niere zutreffend, welche in dieser Arbeit untersucht wurden.

Da die funktionellen Annotierungen sowohl für Proteine als auch für Transkripte von der gleichen Datenbank gewonnen wurden, und weil die Einteilung der funktionellen Kategorien für Proteine und für Transkripte unterschiedlich ist, spiegelt die Verteilung der funktionellen Kategorien nicht bloß die Zusammensetzung der Datenbank wider. Stattdessen ist es denkbar, dass die Unterschiede in der relativen Regulierung der funktionellen Kategorien die Folge von unterschiedlichen Präferenzen der Proteom und Transkriptom Methoden sind.

B.2 Transkriptionelle und translationelle Regulation

Der Vergleich mittels DNA-Chiptechnologie und die 2D-Gelelektrophorese ermöglichte die Regulation auf der Ebene der Transkription und *post*-Transkription miteinander in Beziehung zu bringen. In dem gewählten experimentellen Ansatz kann die Analyse der Expression auf der Ebene der Transkripte von differentiell exprimierten Proteinen auf einfache Weise erfolgen, da alle Proben auf dem verwendeten DNA-Chip sequenziert worden sind. Im umgekehrten Fall würde das Auffinden eines korrespondierenden Proteins von einem differentiellen Transkript auf dem 2D-Gel spezifische Antikörper oder eine systematische proteinmassenspektroskopische Analyse von allen Spots auf den 2D-Gelen erforderlich machen.

Der Großteil der differentiellen Proteine wurde mit der gleichen Tendenz in der DNA-Chipanalyse reguliert (Ergebnisse, Abbildung 13). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass für die meisten differentiellen Proteine die Genexpression auf der Transkriptionsebene gut mit

der Proteinexpression korreliert. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die differentiellen Proteine zur Gruppe der in den 2D-Gelen stark exprimierten Proteine gehörten und somit keine repräsentative Auswahl darstellen. Auf ähnliche Weise wurde eine genaue Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression in pankreatischen *islet*-Zellen von Nagetieren (Cardozo et al., 2003) und in Mitochondrien von verschiedenen Mausegeweben (Mootha et al., 2003) nahe gelegt.

Fünf differentielle Proteine (Rnf20, Actr3, Mtx2, Ak1, und Dnahc11) zeigten hingegen keine Regulation auf RNA-Ebene, was vermuten lässt, dass die differentielle Expression dieser Proteine auf deren Stabilität oder auf Unterschiede in deren Sekretion zurückzuführen ist oder von der Ansammlung dieser Proteine herrührt. Außerdem waren die beiden in der Niere regulierten Proteine Fhl und Fah in der Leber, aber nicht in der Niere stark transkribiert, was auf das Vorhandensein von unterschiedlichen Umsatzraten oder Translationseffizienzen in beiden Geweben hindeutet. Ein weiterer Grund für die fehlende Korrelation zwischen mRNA-Molekülen und den aus ihnen gebildeten Proteinmolekülen ist, dass Proteinprodukte von exprimierten Genen in der Zelle unterschiedlich assoziiert und lokalisiert sind (Urlinger et al., 1997). Darüber hinaus liegt dieser Unterschied auch in der unterschiedlichen Halbwertszeit von RNA-Molekülen in der Zelle begründet (Varshavsky, 1996), die den Zeitraum angibt, in dem die mRNA vor dem Abbau für Translationsvorgänge zur Verfügung steht. Beispielsweise haben Strukturproteine, die in großer Zahl in der Zelle vorkommen können, eine lange Halbwertszeit. Deshalb liegen für sie kaum Transkripte vor. Andererseits können gewisse Effektorproteine nur unter bestimmten Umständen von einer Zelle produziert und sezerniert werden. Ihre Transkripte liegen in der ruhenden Zelle nicht vor, werden aber nach der Zellaktivierung in großen Mengen gebildet. Die prozessierte RNA kann außerdem zellulären Regulationsmechanismen unterworfen sein, die beispielsweise die RNA-Stabilität beeinflussen und zu großen Unterschieden zwischen den mRNA-Molekülen und den Proteinen führen.

Der Vergleich der Genregulation auf der Transkript- und Proteinebene konnte somit den Beweis liefern, dass eine solche vergleichende Methode im Prinzip durchführbar (*proof-of-principle*) und komplementär ist.

C Chromosomale Co-Lokalisation von differentiell exprimierten Genen in Leber- und Nierengewebe der Maus

Die vergleichende Transkriptomanalyse der zwei funktionell verschiedenen Gewebe von Leber und Niere führte zur Identifizierung von weit mehr als 1.000 signifikant differentiell exprimierten Genen. Aufgrund der hohen Anzahl an Genen, die offensichtlich miteinander in einem biologischen Zusammenhang stehen, ergab sich die Chance, diese hinsichtlich ihrer chromosomalen Lokalisation zu untersuchen und zu erfragen, ob die co-regulierte Genexpression mit der Co-Lokalisation innerhalb des Genoms korreliert. Anhand der Analyseergebnisse konnten insgesamt 29 Cluster von co-exprimierten Genen beschrieben werden.

C.1 Identifizierung von chromosomalen Regionen co-exprimierter Gene

Vor kurzem wurden bereits chromosomale Regionen von co-exprimierten Genen beispielsweise basierend auf Genexpressionsprofilaten in der Hefe, *C. elegans*, *Drosophila*, Mensch und Maus identifiziert (Caron et al., 2001; Cohen et al., 2000; Roy et al., 2002; Spellman and Rubin, 2002; Su et al., 2004). Die Co-Regulation von räumlich miteinander gekoppelten Genen durch gemeinsam verwendete *cis*-Sequenzelemente (wie LCRs, Enhancer, Repressoren, Isolatoren, MARs, SARs ect.) konnte für Genfamilienmitglieder wie *apoE*-, α -Globin-, β -Globin-, *Hox*-Gene und andere (Allan et al., 1997; Engel and Tanimoto, 2000; Li et al., 1999; Spitz et al., 2003) beschrieben werden. Beispielsweise enthält das Leberspezifische humane Apo-Gencluster zwei verschiedene hepatische Kontrollregionen (HCRs), die sich 15 kb (HCR.1) bzw. 26 kb (HCR.2) stromabwärts der *apoE*-Gene befinden (Allan et al., 1997).

Die Suche nach chromosomalen Co-Lokalisationen von differentiell exprimierten Genen innerhalb dieser Arbeit lieferte ähnliche Ergebnisse. So konnte anhand unserer Expressionsdaten beispielsweise das proximale Serpin-Subcluster als eine Gruppe von miteinander gekoppelten und differentiell regulierten Genen identifiziert werden. Die chromosomale Anordnung dieser Gene ist zum großen Teil zwischen Maus und Mensch konserviert. Eine Ausnahme bildet das humane *SERINAI*-Gen, welches in fünf Isoformen in der Maus vorkommt (Goodwin et al., 1997). Kürzlich konnte eine Kontrollregion im humanen Locus identifiziert werden, welche für die SERPIN-Genaktivierung und Chromatinumwandlung des proximalen Subclusters verantwortlich ist (Marsden and Fournier, 2003).

Die evolutionäre Konservierung von chromosomal co-lokalisierten, co-regulierten Transkripten deutet auf einen diese Organisation aufrechterhaltenden Selektionsdruck hin. Die Co-Regulierung von miteinander gekoppelten Genen könnte entweder durch das Teilen von *cis*-regulatorischen Wechselwirkungen vermittelt werden oder alternativ mit einer allgemeineren oder über lange Distanzen wirkenden Eigenschaft von genomischen Sequenzen assoziiert sein (Li et al., 2002; Spitz et al., 2003; Zakany et al., 2004).

C.2 *Zusammenhang zwischen chromosomaler Lokalisation und Co-Expression*

Zusätzliche Daten deuten darauf hin, dass zumindest einige Gene, die in der durchgeführten Analyse als co-exprimiert identifiziert wurden, tatsächlich durch die gleichen regulatorischen Faktoren co-reguliert werden könnten. Beispielsweise erfordert die differentielle Expression der *Serpin*- und *Fetuin*-Cluster in der Leber zumindest teilweise die gleichen Transkriptionsfaktoren. Das humane HNF3 (*Hnf3* oder *Foxa3* in der Maus; Rang 166 in den RNA-Expressionsdaten der Leber; Zusatztable 2; (Mijalski et al., 2005)) ist ein essentieller Faktor für die transkriptionelle Regulation von vielen hepatischen Genen, welcher die Chromatinstruktur durch Verdrängen von Linker-Histonen mindestens beim Serum-Albumin-Enhancer beeinflusst. Es wurde ebenfalls vermutet, dass HNF3 zu den potentiellen Faktoren gehört, welche die Expression der *SERPIN*-Gene regulieren (Cirillo and Zaret, 1999; Costa et al., 1989; Marsden and Fournier, 2003). HNF3-Bindestellen wurden ebenfalls in dem Leberspezifischen Gen *FETUIN* (*AHSG*) identifiziert. In der Maus sind *Ahsg* (*Alpha-2-HS-glycoprotein*, *Fetuin-A*) und *Fetub* (*Fetuin beta*) direkt benachbarte Gene innerhalb von ungefähr 50 kb auf Chromosom 16 (Chromosom 3 beim Menschen) (Denecke et al., 2003). Beide Gene, *Ahsg* (repräsentiert durch zwei Proben Rang 8 und Rang 10) und *Fetub* (Rang 635) wurden in der Leber stark exprimiert und konnten in der Niere entweder nur schwach oder gar nicht nachgewiesen werden (Zusatztable 2; (Mijalski et al., 2005)). Auf diesen Beobachtungen basierend konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Co-Lokalisation von co-exprimierten Genen in dieser Studie zumindest teilweise von funktioneller Relevanz ist.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Co-Lokalisation von Genen eine Möglichkeit darstellt, um die Expression von Genen in komplexer Form zu regulieren. Sie lassen auch vermuten, wie komplex das Netzwerk an Mechanismen ist, das dieser Art der Regulation zugrunde liegt. Um weitere Hinweise auf die möglichen funktionellen Zusammenhänge der

oben genannten, in Clustern co-lokalisierten Gene zu erhalten, sind weitere Experimente notwendig, beispielsweise in Form von Deletionsstudien.

D Analyse der Promotorregion des *Dll1*-Gens in transgenen Mäusen

Die transgene Analyse von *cis*-regulatorischen Elementen innerhalb des *Delta1*-Promotors stellt einen ersten Schritt in Richtung der Identifizierung von Transkriptionsfaktoren dar, die für die zeitlich und räumlich regulierte Expression dieses Gens während der Embryonalentwicklung erforderlich sind.

D.1 Regulation des *Dll1*-Gens

Aus Vorexperimenten ist bekannt, dass das MSDI-B (Mesodermale Domäne-„B“) für die Expression von *Dll1* im Mesoderm verantwortlich ist. Da die durch dieses Fragment induzierte Expression sehr spezifisch ist, bietet es sich an, diesen Bereich auf regulatorische Bindestellen zu untersuchen.

Erste Forschungsergebnisse konnten bereits Hinweise auf die Regulation des *Dll1*-Gens im Mesoderm geben. Erst kürzlich wurde bekannt, dass der Transkriptionsfaktor LEF1, der als nuklearer Mediator innerhalb des *Wnt*-Signalwegs fungiert, indem er zusammen mit *beta-catenin* *Wnt*-gesteuerte Gene aktiviert (van Noort et al., 2002a; van Noort et al., 2002b), auch mehrere Stellen des *Dll1*-Promotorelements bindet, welche für die mesodermale Expression *in vivo* verantwortlich sind. Die Mutation dieser LEF-1-Bindestellen im *Dll1*-Promotor führte dazu, dass die Expression von *Dll1-lacZ* transgenen Mäusen im präsomitischen Mesoderm beeinträchtigt wurde (Galceran et al., 2004). Dieses Resultat zeigt, dass der *Wnt*-Signalweg, welcher dem Notch-Signalweg in der Somitogenese der Vertebraten vorgeschaltet ist, den Notch-Delta-Signalweg durch LEF1-vermittelte Regulation von *Dll1* beeinflussen kann.

Weitere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren mit dem T-Box-Transkriptionsfaktor TBX6, der spezifisch im Primitivstreifen und im präsomitischen Mesoderm exprimiert ist (Chapman et al., 1996), kooperieren, um die Transkription von *Dll1* im präsomitischen Mesoderm zu aktivieren (Hofmann et al., 2004). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Aktivität von *Wnt* im Zusammenspiel mit TBX6, die *Dll1*-Transkription und damit auch die Aktivität von Notch sowie die Somiten- und Musterbildung kontrollieren kann.

D.2 Erstellung von *Dll1*-Promotor-Deletionsmutanten

Mit Hilfe einer matrixgestützten *in silico*-Analyse wurden als putative Transkriptionsfaktorbindestellen zwei evolutionär konservierte Sequenzbereiche identifiziert (Zusammenarbeit mit Dr. T. Werner, GSF, Neuherberg). Innerhalb dieser Arbeit wurden zur Überprüfung ihrer Funktion *in vivo* die putativen Sequenzmotive mutiert und vor einem Minimalpromotor des *Dll1*-Gens und dem Reportergen *LacZ* kloniert. Die Klonierung der Konstrukte konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Die vier Konstrukte (Ergebnisse, Abbildung 17) wurden zur Herstellung von transgenen Mäusen bereits erfolgreich genutzt. Erste Genotypisierungen der F1-Generation konnten zeigen, dass das injizierte Konstrukt ins Genom integriert ist. Eine Rückkreuzung zu wildtypischen Mäusen zeigte außerdem, dass das transgene Allel weitervererbt wird. Die *LacZ*-Färbungen stehen aus. Daher können an dieser Stelle noch keine Ergebnisse der Deletionsstudien diskutiert werden. Es bleibt abzuwarten, ob die Deletion der Bereiche innerhalb des *Dll1*-Promotors einen Verlust oder eine Veränderung der mesodermalen Expression von *Dll1* aufgrund fehlender putativer Transkriptionsfaktorbindestellen zur Folge hat. Das Konstrukt (Ergebnisse, Abbildung 17 (a)) ohne Deletion ist in diesem Zusammenhang als Kontrollkonstrukt anzusehen, welches auf jeden Fall eine endogene Expression von *Dll1* im paraxialen Mesoderm hervorrufen sollte.

AUSBLICK

RNA- Expressionsanalyse von Mausembryonen mit inaktiviertem Gen, anhand der *Dll1*-knock-out-Maus

Anhand von Ganzkörper-*in situ*-Hybridisierungen an Mausembryonen (Tag 11,5 *p. c.*) konnte gezeigt werden, dass die aus dem Kandidatenpool ausgewählten 15 am stärksten hoch-regulierten Gene tatsächlich in dem Entwicklungsstadium in Mausgewebe exprimiert wurden und außerdem teilweise mit der Expression von *Dll1* überlappten. In weiteren Experimenten sollen auch die in *Dll1*-defizienten Mäusen runter-regulierten Gene auf ihre Expression untersucht werden und nach einem funktionellen Zusammenhang mit *Dll1* gesucht werden.

RNA-Expressionsanalyse in Mausgehirnen mit gewebespezifisch inaktiviertem Gen, anhand der Thioredoxinreduktase 1-knock-out-Maus

Mit der RNA-Expressionsanalyse war es möglich nachzuweisen, dass die gehirnspezifischen Gene *Zic1* und *Txnrd1* nicht nur in den gleichen Geweben exprimiert, sondern auch ähnlich reguliert werden. Weitere Analysen sind notwendig, um eine funktionelle Verbindung zwischen den Genen aufzuzeigen. In weiteren Experimenten muss außerdem die Frage beantwortet werden, warum *Agt* auf unseren DNA-Chips differentiell hochreguliert ist und ob *Agt* und *Txnrd1* sich gegenseitig regulieren oder einer gemeinsamen funktionellen Regulation unterliegen. Eine Veröffentlichung der erhaltenen Ergebnisse ist in Zusammenarbeit mit Prof. Schmidt (AVM, GSF, Neuherberg) ist in Vorbereitung.

RNA-Expressionsanalyse von Gehirnen mit Creatin behandelte Mäuse

In RNA-Expressionsanalyse von Gehirnen mit Creatin behandelte *versus* unbehandelte Mäuse konnten keine signifikant differentiell exprimierten Gene detektiert werden.

Inzwischen wurden weitere RNA-Expressionsprofile erstellt. Dabei wurde die Analyse ausgeweitet, indem eine höhere Anzahl an Experimenten durchgeführt und ein kommerzieller, ebenfalls genomumfassender DNA-Chip (Affymetrix) verwendet wurde. Außerdem wurden die untersuchten Kontrolltiere (unbehandelte Mäuse) individuell für die RNA-Expressionsanalyse eingesetzt (keine RNA-Pools), so dass der Einfluss der biologischen Variabilität in der Auswertung berücksichtigt werden kann. Die Ergebnisse dieser Analyse werden momentan ausgewertet. Eine wissenschaftliche Publikation ist in Zusammenarbeit mit

den Kollaborationspartnern PD Dr. Thomas Klopstock und Dr. Andreas Bender (LMU München) in Vorbereitung.

Chromosomale Co-Lokalisation von differentiell exprimierten Genen in Leber- und Nierengewebe der Maus

Die Cluster von den in dieser Studie identifizierten co-exprimierten Genen liefern eine Basis für die Identifizierung von gemeinsamen regulatorischen Sequenzen. Diese müssen mit Hilfe von *in silico*-Methoden systematisch analysiert werden. Das soll durch die Kombination verschiedener Strategien erfolgen. Zuerst sollen aufwärts gelegene Sequenzen von co-exprimierten Genen nach gemeinsamen Mustern oder Modulen von Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht werden. Diese Methode auf Genebene wird vervollständigt mit regionweisenden intra- und interspezifischen vergleichenden Methoden, um nach bekannten und potentiell neuen, über lange Distanzen wirkenden Kontrollregionen zu suchen. Vorhersagen von regulatorischen Sequenzen sollen dann anhand von funktionellen *in vivo*-Mutagenesestudien erfolgen.

Analyse der Promotorregion des *Dll1*-Gens in transgenen Mäusen

Innerhalb dieser Arbeit gelang es vier verschiedene MSDI-B-Konstrukte zu generieren, deren erfolgreiche Klonierung mittels Sequenzanalyse zu verifizieren, transgene Nachkommen heranzuziehen und mittels Genotypisierungen nachzuweisen, dass die einzelnen Transgene in das Genom der Tiere der F1-Generation integriert wurden.

In nachfolgenden Experimenten sollen histochemische Färbungen erfolgen, um die Proteinaktivität der β -Galaktosidase in den transgenen Embryonen von 8,5 bis 12,5 *p.c.* festzustellen. Anhand dieses Nachweises ist es möglich zu analysieren, ob die Deletionen der Bereiche innerhalb des *Dll1*-Promotors einen Verlust oder eine Veränderung der mesodermalen Expression von *Dll1* aufgrund fehlender putativer Transkriptionsfaktorbindestellen zur Folge hat.

LITERATUR

- Abel, K., Gross, K. (1986). Mapping and expression analyses of murine angiotensinogen genes" *Mouse News Lett* 1986;74():108-109
- Allan, C. M., Taylor, S., and Taylor, J. M. (1997). Two hepatic enhancers, HCR.1 and HCR.2, coordinate the liver expression of the entire human apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster. *J Biol Chem* 272, 29113-29119.
- Allan, C. M., Walker, D., Segrest, J. P., and Taylor, J. M. (1995). Identification and characterization of a new human gene (APOC4) in the apolipoprotein E, C-I, and C-II gene locus. *Genomics* 28, 291-300.
- Allan, D., and Lohnes, D. (2000). Cloning and developmental expression of mouse aldehyde reductase (AKR1A4). *Mech Dev* 94, 271-275.
- Anderson, N. L., Eisler, W. J., and Anderson, N. G. (1978). Analytical techniques for cell fractions. XXIII. A stable thermal gradient device for heat denaturation studies on proteins. *Anal Biochem* 91, 441-445.
- Anderson, P. (1995). Mutagenesis. *Methods Cell Biol* 48, 31-58.
- Andreassen, O. A., Dedeoglu, A., Ferrante, R. J., Jenkins, B. G., Ferrante, K. L., Thomas, M., Friedlich, A., Browne, S. E., Schilling, G., Borchelt, D. R., *et al.* (2001). Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8, 479-491.
- Andres, R. H., Ducray, A. D., Huber, A. W., Perez-Bouza, A., Krebs, S. H., Schlattner, U., Seiler, R. W., Wallimann, T., and Widmer, H. R. (2005). Effects of creatine treatment on survival and differentiation of GABA-ergic neurons in cultured striatal tissue. *J Neurochem*.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D. J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877-881.
- Appel, B., and Eisen, J. S. (1998). Regulation of neuronal specification in the zebrafish spinal cord by Delta function. *Development* 125, 371-380.
- Aruga, J., Inoue, T., Hoshino, J., and Mikoshiba, K. (2002a). Zic2 controls cerebellar development in cooperation with Zic1. *J Neurosci* 22, 218-225.
- Aruga, J., Tohmonda, T., Homma, S., and Mikoshiba, K. (2002b). Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Dev Biol* 244, 329-341.
- Aruga, J., Yokota, N., Hashimoto, M., Furuichi, T., Fukuda, M., and Mikoshiba, K. (1994). A novel zinc finger protein, zic, is involved in neurogenesis, especially in the cell lineage of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 63, 1880-1890.
- Ashburner, M. (1982). The genetics of a small autosomal region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. III. Hypomorphic and hypermorphic mutations affecting the expression of hairless. *Genetics* 101, 447-459.
- Athman, R., Louvard, D., and Robine, S. (2003). Villin enhances hepatocyte growth factor-induced actin cytoskeleton remodeling in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 14, 4641-4653.

- Bailey, A. M., and Posakony, J. W. (1995). Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* 9, 2609-2622.
- Balling, R. (2001). ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, 463-492.
- Baron, M., Aslam, H., Flasza, M., Fostier, M., Higgs, J. E., Mazaleyrat, S. L., and Wilkin, M. B. (2002). Multiple levels of Notch signal regulation (review). *Mol Membr Biol* 19, 27-38.
- Barone, K. S., O'Brien, P. C., and Stevenson, J. R. (1993). Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. *Cell Immunol* 148, 226-233.
- Beckers, J., Caron, A., Hrabe de Angelis, M., Hans, S., Campos-Ortega, J. A., and Gossler, A. (2000). Distinct regulatory elements direct delta1 expression in the nervous system and paraxial mesoderm of transgenic mice. *Mech Dev* 95, 23-34.
- Beckers, J., Clark, A., Wunsch, K., Hrabe De Angelis, M., and Gossler, A. (1999). Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development. *Mech Dev* 84, 165-168.
- Beckers, J., Herrmann, F., Rieger, S., Drobyshev, A. L., Horsch, M., Hrabe de Angelis, M., and Seliger, B. (2005). Identification and validation of novel ERBB2 (HER2, NEU) targets including genes involved in angiogenesis. *Int J Cancer* 114, 590-597.
- Beier, D. R., and Herron, B. J. (2004). Genetic mapping and ENU mutagenesis. *Genetica* 122, 65-69.
- Bender, A., Auer, D. P., Merl, T., Reilmann, R., Saemann, P., Yassouridis, A., Bender, J., Weindl, A., Dose, M., Gasser, T., and Klopstock, T. (2005). Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. *J Neurol* 252, 36-41.
- Bessho, Y., Hirata, H., Masamizu, Y., and Kageyama, R. (2003). Periodic repression by the bHLH factor Hes7 is an essential mechanism for the somite segmentation clock. *Genes Dev* 17, 1451-1456.
- Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). Oscillations, clocks and segmentation. *Curr Opin Genet Dev* 13, 379-384.
- Bettenhausen, B., Hrabe de Angelis, M., Simon, D., Guenet, J. L., and Gossler, A. (1995). Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta. *Development* 121, 2407-2418.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bjorkhem, L., Teclebrhan, H., Kesen, E., Olsson, J. M., Eriksson, L. C., and Bjornstedt, M. (2001). Increased levels of cytosolic thioredoxin reductase activity and mRNA in rat liver nodules. *J Hepatol* 35, 259-264.
- Blaumueller, C. M., Qi, H., Zagouras, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281-291.
- Boffelli, D., Weer, C. V., Weng, L., Lewis, K. D., Shoukry, M. I., Pachter, L., Keys, D. N., and Rubin, E. M. (2004). Intraspecies sequence comparisons for annotating genomes. *Genome Res* 14, 2406-2411.
- Brenden, N., and Bohme, J. (1999). Differential MHC expression requirements for positive selection of separate TCR Vb families. *Immunogenetics* 49, 1-6.

- Bresnick, E. H., Chu, J., Christensen, H. M., Lin, B., and Norton, J. (2000). Linking Notch signaling, chromatin remodeling, and T-cell leukemogenesis. *J Cell Biochem Suppl Suppl 35*, 46-53.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., and Israel, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell 5*, 207-216.
- Brown, D. R., Brousseau, M. E., Shamburek, R. D., Talley, G. D., Meyn, S., Demosky, S. J., Jr., Santamarina-Fojo, S., Brewer, H. B., Jr., and Hoeg, J. M. (1996). Adenoviral delivery of low-density lipoprotein receptors to hyperlipidemic rabbits: receptor expression modulates high-density lipoproteins. *Metabolism 45*, 1447-1457.
- Brown, P. O., and Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet 21*, 33-37.
- Brown, S. D., and Nolan, P. M. (1998). Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function. *Hum Mol Genet 7*, 1627-1633.
- Bulman, M. P., Kusumi, K., Frayling, T. M., McKeown, C., Garrett, C., Lander, E. S., Krumlauf, R., Hattersley, A. T., Ellard, S., and Turnpenny, P. D. (2000). Mutations in the human delta homologue, *DLL3*, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet 24*, 438-441.
- Cabrera, C. V. (1990). Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila*: the interactions between scute, Notch and Delta. *Development 110*, 733-742.
- Campos-Ortega, J. A., and Knust, E. (1990). Molecular analysis of a cellular decision during embryonic development of *Drosophila melanogaster*: epidermogenesis or neurogenesis. *Eur J Biochem 190*, 1-10.
- Cardozo, A. K., Berthou, L., Kruhoffer, M., Orntoft, T., Nicolls, M. R., and Eizirik, D. L. (2003). Gene microarray study corroborates proteomic findings in rodent islet cells. *J Proteome Res 2*, 553-555.
- Caron, H., van Schaik, B., van der Mee, M., Baas, F., Riggins, G., van Sluis, P., Hermus, M. C., van Asperen, R., Boon, K., Voute, P. A., *et al.* (2001). The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science 291*, 1289-1292.
- Cecconi, F., and Meyer, B. I. (2000). Gene trap: a way to identify novel genes and unravel their biological function. *FEBS Lett 480*, 63-71.
- Chapman, D. L., Agulnik, I., Hancock, S., Silver, L. M., and Papaioannou, V. E. (1996). *Tbx6*, a mouse T-Box gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev Biol 180*, 534-542.
- Chitnis, A., Henrique, D., Lewis, J., Ish-Horowicz, D., and Kintner, C. (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature 375*, 761-766.
- Cho, K. I., Lee, J. W., Kim, K. S., Lee, E. J., Suh, J. G., Lee, H. J., Kim, H. T., Hong, S. H., Chung, W. H., Chang, K. T., *et al.* (2003). Fine mapping of the circling (*cir*) gene on the distal portion of mouse chromosome 9. *Comp Med 53*, 642-648.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem 162*, 156-159.
- Cirillo, L. A., and Zaret, K. S. (1999). An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell 4*, 961-969.

- Clark, A. J., Ghazal, P., Bingham, R. W., Barrett, D., and Bishop, J. O. (1985). Sequence structures of a mouse major urinary protein gene and pseudogene compared. *Embo J* 4, 3159-3165.
- Coffman, C., Harris, W., and Kintner, C. (1990). Xotch, the *Xenopus* homolog of *Drosophila* notch. *Science* 249, 1438-1441.
- Cohen, B. A., Mitra, R. D., Hughes, J. D., and Church, G. M. (2000). A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nat Genet* 26, 183-186.
- Corbin, V., Michelson, A. M., Abmayr, S. M., Neel, V., Alcamo, E., Maniatis, T., and Young, M. W. (1991). A role for the *Drosophila* neurogenic genes in mesoderm differentiation. *Cell* 67, 311-323.
- Costa, R. H., Grayson, D. R., and Darnell, J. E., Jr. (1989). Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* 9, 1415-1425.
- Dale, K. J., and Pourquie, O. (2000). A clock-work somite. *Bioessays* 22, 72-83.
- De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., *et al.* (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- Dechent, P., Pouwels, P. J., Wilken, B., Hanefeld, F., and Frahm, J. (1999). Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* 277, R698-704.
- Dedeoglu, A., Kubilus, J. K., Yang, L., Ferrante, K. L., Hersch, S. M., Beal, M. F., and Ferrante, R. J. (2003). Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* 85, 1359-1367.
- Del Amo, F. F., Smith, D. E., Swiatek, P. J., Gendron-Maguire, M., Greenspan, R. J., McMahon, A. P., and Gridley, T. (1992). Expression pattern of Motch, a mouse homolog of *Drosophila* Notch, suggests an important role in early postimplantation mouse development. *Development* 115, 737-744.
- Del Sal, G., Ruaro, M. E., Philipson, L., and Schneider, C. (1992). The growth arrest-specific gene, *gas1*, is involved in growth suppression. *Cell* 70, 595-607.
- Denecke, B., Graber, S., Schafer, C., Heiss, A., Woltje, M., and Jannen-Dechent, W. (2003). Tissue distribution and activity testing suggest a similar but not identical function of fetuin-B and fetuin-A. *Biochem J* 376, 135-145.
- Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A., and Chinnaiyan, A. M. (2001). Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412, 822-826.
- Drobyshev, A. L., Hrabe de Angelis, M. and Beckers, J. (2003a). Artefacts and Reliability of DNA Microarray Expression Profiling Data. *Current Genomics* 4, 615-621.
- Duggan, D.J., Bittner, M.L., Chen, Y., Meltzer, P.S., Trent, J.M. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet* 21: 10--14.
- Dunwoodie, S. L., Henrique, D., Harrison, S. M., and Beddington, R. S. (1997). Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Development* 124, 3065-3076.

- Ehling, U. H., Charles, D. J., Favor, J., Graw, J., Kratochvilova, J., Neuhauser-Klaus, A., and Pretsch, W. (1985). Induction of gene mutations in mice: the multiple endpoint approach. *Mutat Res* 150, 393-401.
- Ellis, A. C., and Rosenfeld, J. (2004). The role of creatine in the management of amyotrophic lateral sclerosis and other neurodegenerative disorders. *CNS Drugs* 18, 967-980.
- Engel, J. D., and Tanimoto, K. (2000). Looping, linking, and chromatin activity: new insights into beta-globin locus regulation. *Cell* 100, 499-502.
- Esther, C. R., Jr., Howard, T. E., Marino, E. M., Goddard, J. M., Capecchi, M. R., and Bernstein, K. E. (1996). Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. *Lab Invest* 74, 953-965.
- Ferrante, R. J., Andreassen, O. A., Jenkins, B. G., Dedeoglu, A., Kuemmerle, S., Kubilus, J. K., Kaddurah-Daouk, R., Hersch, S. M., and Beal, M. F. (2000). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 20, 4389-4397.
- Fleming, R. J., Scottgale, T. N., Diederich, R. J., and Artavanis-Tsakonas, S. (1990). The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 4, 2188-2201.
- Forsyth, S., Horvath, A., and Coughlin, P. (2003). A review and comparison of the murine alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics* 81, 336-345.
- Fukamizu, A. (1999). [Angiotensin and arteriosclerosis: an approach from transgenic and knockout mice]. *Nippon Rinsho* 57, 1176-1181.
- Gaffney, D. J., and Keightley, P. D. (2004). Unexpected conserved non-coding DNA blocks in mammals. *Trends Genet* 20, 332-337.
- Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Becker, L., Bolle, I., Brielmeier, M., Calzada-Wack, J., Elvert, R., Ehrhardt, N., Dalke, C., Franz, T. J., *et al.* (2005). Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods* 2, 403-404.
- Galceran, J., Sustmann, C., Hsu, S. C., Folberth, S., and Grosschedl, R. (2004). LEF1-mediated regulation of Delta-like1 links Wnt and Notch signaling in somitogenesis. *Genes Dev* 18, 2718-2723.
- Gauss, C., Kalkum, M., Lowe, M., Lehrach, H., and Klose, J. (1999). Analysis of the mouse proteome. (I) Brain proteins: separation by two-dimensional electrophoresis and identification by mass spectrometry and genetic variation. *Electrophoresis* 20, 575-600.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Georgiou, H. M., Constantinou, D., and Mandel, T. E. (1995a). Neonatal transfer of allogeneic thymic macrophages prevents autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Transplant Proc* 27, 2168-2169.
- Georgiou, H. M., Constantinou, D., and Mandel, T. E. (1995b). Prevention of autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice by neonatal transfer of allogeneic thymic macrophages. *Autoimmunity* 21, 89-97.
- Georgiou, H. M., and Mandel, T. E. (1995). Induction of insulinitis in athymic (nude) mice. The effect of NOD thymus and pancreas transplantation. *Diabetes* 44, 49-59.

- Goodwin, R. L., Barbour, K. W., and Berger, F. G. (1997). Expression of the alpha 1-proteinase inhibitor gene family during evolution of the genus *Mus*. *Mol Biol Evol* 14, 420-427.
- Gorg, A. (1993). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients: current state. *Biochem Soc Trans* 21, 130-132.
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Gossler, A., and Hrabe de Angelis, M. (1998). Somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 38, 225-287.
- Greenwald, I. (1985). *lin-12*, a nematode homeotic gene, is homologous to a set of mammalian proteins that includes epidermal growth factor. *Cell* 43, 583-590.
- Gullans, S. R. (2000). Of microarrays and meandering data points. *Nat Genet* 26, 4-5.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., and Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720-1730.
- Harford J.B. and Morris D.R. 1997. Post-transcriptional gene regulation. Wiley-Liss Inc., New York, N.Y.
- Halgren, R. G., Fielden, M. R., Fong, C. J., and Zacharewski, T. R. (2001). Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucleic Acids Res* 29, 582-588.
- Hanninen, A., Jaakkola, I., Salmi, M., Simell, O., and Jalkanen, S. (1997). Ly-6C regulates endothelial adhesion and homing of CD8(+) T cells by activating integrin-dependent adhesion pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6898-6903.
- Hansen, J., Floss, T., Van Sloun, P., Fuchtbauer, E. M., Vauti, F., Arnold, H. H., Schnutgen, F., Wurst, W., von Melchner, H., and Ruiz, P. (2003). A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9918-9922.
- Hazel, T. G., Nathans, D., and Lau, L. F. (1988). A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8444-8448.
- Henderson, S. T., Gao, D., Christensen, S., and Kimble, J. (1997). Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 8, 1751-1762.
- Henderson, S. T., Gao, D., Lambie, E. J., and Kimble, J. (1994). *lag-2* may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development* 120, 2913-2924.
- Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D., and Peterson, M. G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92-95.
- Henrique, D., Adam, J., Myat, A., Chitnis, A., Lewis, J., and Ish-Horowicz, D. (1995). Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick. *Nature* 375, 787-790.
- Hirsch, E. C., and Faucheux, B. A. (1998). Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1, 39-45.
- Ho, W. Z., Lai, J. P., Li, Y., and Douglas, S. D. (2002). HIV enhances substance P expression in human immune cells. *Faseb J* 16, 616-618.

- Hoffer, M. J., Hofker, M. H., van Eck, M. M., Havekes, L. M., and Frants, R. R. (1993). Evolutionary conservation of the mouse apolipoprotein e-c1-c2 gene cluster: structure and genetic variability in inbred mice. *Genomics* 15, 62-67.
- Hofmann, M., Schuster-Gossler, K., Watabe-Rudolph, M., Aulehla, A., Herrmann, B. G., and Gossler, A. (2004). WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev* 18, 2712-2717.
- Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* 54, 237-271.
- Hrabe de Angelis, M., and Balling, R. (1998). Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat Res* 400, 25-32.
- Hrabe de Angelis, M., McIntyre, J., 2nd, and Gossler, A. (1997). Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717-721.
- Hsieh, J. J., and Hayward, S. D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-563.
- Hu, J., Ma, X., Lindner, D. J., Karra, S., Hofmann, E. R., Reddy, S. P., and Kalvakolanu, D. V. (2001). Modulation of p53 dependent gene expression and cell death through thioredoxin-thioredoxin reductase by the Interferon-Retinoid combination. *Oncogene* 20, 4235-4248.
- Hughes, T. R., Roberts, C. J., Dai, H., Jones, A. R., Meyer, M. R., Slade, D., Burchard, J., Dow, S., Ward, T. R., Kidd, M. J., *et al.* (2000). Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat Genet* 25, 333-337.
- Jakupoglu, C., Przemeck, G. K., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., de Angelis, M. H., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Brielmeier, M., and Conrad, M. (2005). Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol* 25, 1980-1988.
- Jen, W. C., Wettstein, D., Turner, D., Chitnis, A., and Kintner, C. (1997). The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos. *Development* 124, 1169-1178.
- Jiang, Y. J., Brand, M., Heisenberg, C. P., Beuchle, D., Furutani-Seiki, M., Kelsh, R. N., Warga, R. M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., *et al.* (1996). Mutations affecting neurogenesis and brain morphology in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 205-216.
- Jin, K., Mao, X. O., Eshoo, M. W., del Rio, G., Rao, R., Chen, D., Simon, R. P., and Greenberg, D. A. (2002). cDNA microarray analysis of changes in gene expression induced by neuronal hypoxia in vitro. *Neurochem Res* 27, 1105-1112.
- Jin, O., Feng, D., and Cheng, R. (1999). [Observation of apoptosis and proliferation in nasopharyngeal carcinoma]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 24, 421-424.
- Jochheim, A., Cieslak, A., Hillemann, T., Cantz, T., Scharf, J., Manns, M. P., and Ott, M. (2003). Multi-stage analysis of differential gene expression in BALB/C mouse liver development by high-density microarrays. *Differentiation* 71, 62-72.
- Joyner, A. L., Auerbach, A., and Skarnes, W. C. (1992). The gene trap approach in embryonic stem cells: the potential for genetic screens in mice. *Ciba Found Symp* 165, 277-288; discussion 288-297.
- Justice, M. J., Noveroske, J. K., Weber, J. S., Zheng, B., and Bradley, A. (1999). Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 8, 1955-1963.

- Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Goto, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1997). Anti-apoptotic action of angiotensin fragments to neuronal cells from angiotensinogen knock-out mice. *Neurosci Lett* 232, 167-170.
- Kakinuma, Y., Hama, H., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. (1998). Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat Med* 4, 1078-1080.
- Kalaydjieva, L., Gresham, D., Gooding, R., Heather, L., Baas, F., de Jonge, R., Blechschmidt, K., Angelicheva, D., Chandler, D., Worsley, P., *et al.* (2000). N-myc downstream-regulated gene 1 is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy-Lom. *Am J Hum Genet* 67, 47-58.
- Karolchik, D., Baertsch, R., Diekhans, M., Furey, T. S., Hinrichs, A., Lu, Y. T., Roskin, K. M., Schwartz, M., Sugnet, C. W., Thomas, D. J., *et al.* (2003). The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Res* 31, 51-54.
- Karolchik, D., Hinrichs, A. S., Furey, T. S., Roskin, K. M., Sugnet, C. W., Haussler, D., and Kent, W. J. (2004). The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic Acids Res* 32, D493-496.
- Kawai, H., Ota, T., Suzuki, F., and Tatsuka, M. (2000). Molecular cloning of mouse thioredoxin reductases. *Gene* 242, 321-330.
- Kent, W. J. (2002). BLAT--the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12, 656-664.
- Kimble, J., and Simpson, P. (1997). The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 333-361.
- Klose, J., Nock, C., Herrmann, M., Stuhler, K., Marcus, K., Bluggel, M., Krause, E., Schalkwyk, L. C., Rastan, S., Brown, S. D., *et al.* (2002). Genetic analysis of the mouse brain proteome. *Nat Genet* 30, 385-393.
- Klose, J., and Spielmann, H. (1975). Gel isoelectric focusing of mouse lactate dehydrogenase: heterogeneity of the isoenzymes A4 and X4. *Biochem Genet* 13, 707-720.
- Knight, J. (2001). When the chips are down. *Nature* 410, 860-861.
- Kopczynski, C. C., Alton, A. K., Fechtel, K., Kooh, P. J., and Muskavitch, M. A. (1988). Delta, a *Drosophila* neurogenic gene, is transcriptionally complex and encodes a protein related to blood coagulation factors and epidermal growth factor of vertebrates. *Genes Dev* 2, 1723-1735.
- Kotake, Y., Tasaki, Y., Makino, Y., Ohta, S., and Hirobe, M. (1995). 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline as a parkinsonism-inducing agent: a novel endogenous amine in mouse brain and parkinsonian CSF. *J Neurochem* 65, 2633-2638.
- Krantz, I. D. (2002). Alagille syndrome: chipping away at the tip of the iceberg. *Am J Med Genet* 112, 160-162.
- Krantz, I. D., Piccoli, D. A., and Spinner, N. B. (1997). Alagille syndrome. *J Med Genet* 34, 152-157.
- Krebs, L. T., Iwai, N., Nonaka, S., Welsh, I. C., Lan, Y., Jiang, R., Saijoh, Y., O'Brien, T. P., Hamada, H., and Gridley, T. (2003). Notch signaling regulates left-right asymmetry determination by inducing Nodal expression. *Genes Dev* 17, 1207-1212.
- Ku, N. O., Darling, J. M., Krams, S. M., Esquivel, C. O., Keeffe, E. B., Sibley, R. K., Lee, Y. M., Wright, T. L., and Omary, M. B. (2003). Keratin 8 and 18 mutations are risk factors for developing liver disease of multiple etiologies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6063-6068.

- Lambie, E. J., and Kimble, J. (1991a). Genetic control of cell interactions in nematode development. *Annu Rev Genet* 25, 411-436.
- Lambie, E. J., and Kimble, J. (1991b). Two homologous regulatory genes, *lin-12* and *glp-1*, have overlapping functions. *Development* 112, 231-240.
- Lammert, E., Brown, J., and Melton, D. A. (2000). Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech Dev* 94, 199-203.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Lardelli, M., Dahlstrand, J., and Lendahl, U. (1994). The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech Dev* 46, 123-136.
- Lardelli, M., and Lendahl, U. (1993). Motch A and motch B--two mouse Notch homologues coexpressed in a wide variety of tissues. *Exp Cell Res* 204, 364-372.
- Larsson, C., Lardelli, M., White, I., and Lendahl, U. (1994). The human NOTCH1, 2, and 3 genes are located at chromosome positions 9q34, 1p13-p11, and 19p13.2-p13.1 in regions of neoplasia-associated translocation. *Genomics* 24, 253-258.
- Lecourtois, M., and Schweisguth, F. (1995). The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* 9, 2598-2608.
- Lee, M. L., Kuo, F. C., Whitmore, G. A., and Sklar, J. (2000). Importance of replication in microarray gene expression studies: statistical methods and evidence from repetitive cDNA hybridizations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9834-9839.
- Lewis, J. (1998). Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* 9, 583-589.
- Li, Q., Harju, S., and Peterson, K. R. (1999). Locus control regions: coming of age at a decade plus. *Trends Genet* 15, 403-408.
- Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood* 100, 3077-3086.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Lindner, D. J., Ma, X., Hu, J., Karra, S., and Kalvakolanu, D. V. (2002). Thioredoxin reductase plays a critical role in IFN retinoid-mediated tumor-growth control in vivo. *Clin Cancer Res* 8, 3210-3218.
- Lindsell, C. E., Shawber, C. J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80, 909-917.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14, 1675-1680.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., and Israel, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8108-8112.

Lottspeich F. Zorbas H. 1998. Bioanalytik. Spektrum Verlag, Heidelberg. Berlin

Lutolf, S., Radtke, F., Aguet, M., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* 129, 373-385.

Ma, X., Hu, J., Lindner, D. J., and Kalvakolanu, D. V. (2002). Mutational analysis of human thioredoxin reductase 1. Effects on p53-mediated gene expression and interferon and retinoic acid-induced cell death. *J Biol Chem* 277, 22460-22468.

Machka, C., Kersten, M., Zobawa, M., Harder, A., Horsch, M., Halder, T., Lottspeich, F., Hrabe de Angelis, M., and Beckers, J. (2005). Identification of Dll1 (Delta1) target genes during mouse embryogenesis using differential expression profiling. *Gene Expr Patterns*.

Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-630.

Marsden, M. D., and Fournier, R. E. (2003). Chromosomal elements regulate gene activity and chromatin structure of the human serpin gene cluster at 14q32.1. *Mol Cell Biol* 23, 3516-3526.

Maruyama, W., Abe, T., Tohgi, H., and Naoi, M. (1999). An endogenous MPTP-like dopaminergic neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, in the cerebrospinal fluid decreases with progression of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 262, 13-16.

Matsunami, N., Hamaguchi, Y., Yamamoto, Y., Kuze, K., Kangawa, K., Matsuo, H., Kawaichi, M., and Honjo, T. (1989). A protein binding to the J kappa recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. *Nature* 342, 934-937.

McRedmond, J. P., Park, S. D., Reilly, D. F., Coppinger, J. A., Maguire, P. B., Shields, D. C., and Fitzgerald, D. J. (2004). Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics* 3, 133-144.

Mijalski, T., Harder, A., Halder, T., Kersten, M., Horsch, M., Strom, T. M., Liebscher, H. V., Lottspeich, F., de Angelis, M. H., and Beckers, J. (2005). Identification of coexpressed gene clusters in a comparative analysis of transcriptome and proteome in mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8621-8626.

Miki, R., Kadota, K., Bono, H., Mizuno, Y., Tomaru, Y., Carninci, P., Itoh, M., Shibata, K., Kawai, J., Konno, H., *et al.* (2001). Delineating developmental and metabolic pathways in vivo by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2199-2204.

Milsted, A., Barna, B. P., Ransohoff, R. M., Brosnihan, K. B., and Ferrario, C. M. (1990). Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5720-5723.

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., and Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.

Moos, P. J., Edes, K., Cassidy, P., Massuda, E., and Fitzpatrick, F. A. (2003). Electrophilic prostaglandins and lipid aldehydes repress redox-sensitive transcription factors p53 and hypoxia-inducible factor by impairing the selenoprotein thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 278, 745-750.

Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., *et al.* (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115, 629-640.

- Morrison, A., Hodgetts, C., Gossler, A., Hrabe de Angelis, M., and Lewis, J. (1999). Expression of Delta1 and Serrate1 (Jagged1) in the mouse inner ear. *Mech Dev* 84, 169-172.
- Mural, R. J., Adams, M. D., Myers, E. W., Smith, H. O., Miklos, G. L., Wides, R., Halpern, A., Li, P. W., Sutton, G. G., Nadeau, J., *et al.* (2002). A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* 296, 1661-1671.
- Myat, A., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Lewis, J. (1996). A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis. *Dev Biol* 174, 233-247.
- Nadeau, J. H., Balling, R., Barsh, G., Beier, D., Brown, S. D., Bucan, M., Camper, S., Carlson, G., Copeland, N., Eppig, J., *et al.* (2001). Sequence interpretation. Functional annotation of mouse genome sequences. *Science* 291, 1251-1255.
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Gunther, T., Sporle, R., Schughart, K., and Mikoshiba, K. (1997). The expression of the mouse *Zic1*, *Zic2*, and *Zic3* gene suggests an essential role for *Zic* genes in body pattern formation. *Dev Biol* 182, 299-313.
- Nature Genetics volume 21, Supplement (1999). A special supplement from Nature Genetics which provides an overview of the production and utilisation of DNA-micro-chips.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
- Oda, T., Elkahoul, A. G., Meltzer, P. S., and Chandrasekharappa, S. C. (1997). Identification and cloning of the human homolog (JAG1) of the rat Jagged1 gene from the Alagille syndrome critical region at 20p12. *Genomics* 43, 376-379.
- Oka, C., Nakano, T., Wakeham, A., de la Pompa, J. L., Mori, C., Sakai, T., Okazaki, S., Kawaichi, M., Shiota, K., Mak, T. W., and Honjo, T. (1995). Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* 121, 3291-3301.
- Pandey, A., and Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846.
- Parkkila, S., Kivela, A. J., Kaunisto, K., Parkkila, A. K., Hakkola, J., Rajaniemi, H., Waheed, A., and Sly, W. S. (2002). The plasma membrane carbonic anhydrase in murine hepatocytes identified as isozyme XIV. *BMC Gastroenterol* 2, 13.
- Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P., and Fodor, S. P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5022-5026.
- Petcherski, A. G., and Kimble, J. (2000). LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature* 405, 364-368.
- Pinson, K. I., Dunbar, L., Samuelson, L., and Gumucio, D. L. (1998). Targeted disruption of the mouse villin gene does not impair the morphogenesis of microvilli. *Dev Dyn* 211, 109-121.
- Pourquie, O. (2000). Segmentation of the paraxial mesoderm and vertebrate somitogenesis. *Curr Top Dev Biol* 47, 81-105.
- Pourquie, O. (2003). Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Biol* 47, 597-603.
- Pritchard, C. C., Hsu, L., Delrow, J., and Nelson, P. S. (2001). Project normal: defining normal variance in mouse gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13266-13271.

- Przemeck, G. K., Heinzmann, U., Beckers, J., and Hrabe de Angelis, M. (2003). Node and midline defects are associated with left-right development in Delta1 mutant embryos. *Development* 130, 3-13.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23, 4878-4884.
- Rebay, I., Fleming, R. J., Fehon, R. G., Cherbas, L., Cherbas, P., and Artavanis-Tsakonas, S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-699.
- Ribeiro, J. M., Charlab, R., Pham, V. M., Garfield, M., and Valenzuela, J. G. (2004). An insight into the salivary transcriptome and proteome of the adult female mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 34, 543-563.
- Roy, P. J., Stuart, J. M., Lund, J., and Kim, S. K. (2002). Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 418, 975-979.
- Ruse, C. I., Tan, F. L., Kinter, M., and Bond, M. (2004). Integrated analysis of the human cardiac transcriptome, proteome and phosphoproteome. *Proteomics* 4, 1505-1516.
- Sagai, T., Hosoya, M., Mizushima, Y., Tamura, M., and Shiroishi, T. (2005). Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific Shh expression and truncation of the mouse limb. *Development* 132, 797-803.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandrin, M. S., Apostolopoulos, J., and McKenzie, I. F. (2000). This is an addendum to the February 2000 article by Apostolopoulos et al., "Ly6d-L, a Cell Surface Ligand for Mouse Ly6d." *Immunity* 13, 853-854.
- Sasai, Y., Kageyama, R., Tagawa, Y., Shigemoto, R., and Nakanishi, S. (1992). Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6, 2620-2634.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P. O., and Davis, R. W. (1996). Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10614-10619.
- Schofield, J. P., Cox, T. M., Caskey, C. T., and Wakamiya, M. (1999). Mice deficient in the urea-cycle enzyme, carbamoyl phosphate synthetase I, die during the early neonatal period from hyperammonemia. *Hepatology* 29, 181-185.
- Schuchhardt, J., Beule, D., Malik, A., Wolski, E., Eickhoff, H., Lehrach, H., and Herzog, H. (2000). Normalization strategies for cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res* 28, E47.
- Selmann, M., Horsch, M., Drobyshev, A., Chen, Y., de Angelis, M. H., and Beckers, J. (2005). Assessment of a systematic expression profiling approach in ENU-induced mouse mutant lines. *Mamm Genome* 16, 1-10.
- Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concorde, J. P., Maire, P., and Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene

promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 32529-32537.

Shaw, P. H., Held, W. A., and Hastie, N. D. (1983). The gene family for major urinary proteins: expression in several secretory tissues of the mouse. *Cell* 32, 755-761.

Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C. E., and Weinmaster, G. (1996). Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev Biol* 180, 370-376.

Shear, D. A., Haik, K. L., and Dunbar, G. L. (2000). Creatine reduces 3-nitropropionic-acid-induced cognitive and motor abnormalities in rats. *Neuroreport* 11, 1833-1837.

Shimono, A., Okuda, T., and Kondoh, H. (1999). N-myc-dependent repression of *ndr1*, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech Dev* 83, 39-52.

Shiroishi, H., Ayato, Y., Okada, T., and Kunimatsu, K. (2005). Mechanism of selective oxygen reduction on platinum by 2,2'-bipyridine in the presence of methanol. *Langmuir* 21, 3037-3043.

Shutter, J. R., Scully, S., Fan, W., Richards, W. G., Kitajewski, J., Deblandre, G. A., Kintner, C. R., and Stark, K. L. (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* 14, 1313-1318.

Smithies, O., and Poulik, M. D. (1956). Two-dimensional electrophoresis of serum proteins. *Nature* 177, 1033.

Sorci-Thomas, M., Prack, M. M., Dashti, N., Johnson, F., Rudel, L. L., and Williams, D. L. (1989a). Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. *J Lipid Res* 30, 1397-1403.

Sorci-Thomas, M., Wilson, M. D., Johnson, F. L., Williams, D. L., and Rudel, L. L. (1989b). Studies on the expression of genes encoding apolipoproteins B100 and B48 and the low density lipoprotein receptor in nonhuman primates. Comparison of dietary fat and cholesterol. *J Biol Chem* 264, 9039-9045.

Spellman, P. T., and Rubin, G. M. (2002). Evidence for large domains of similarly expressed genes in the *Drosophila* genome. *J Biol* 1, 5.

Spitz, F., Gonzalez, F., and Duboule, D. (2003). A global control region defines a chromosomal regulatory landscape containing the *HoxD* cluster. *Cell* 113, 405-417.

Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizueté, A., and Gustafsson, J. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 272, 2936-2941.

Stollewerk, A., Schoppmeier, M., and Damen, W. G. (2003). Involvement of Notch and Delta genes in spider segmentation. *Nature* 423, 863-865.

Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.

Su, A. I., Cooke, M. P., Ching, K. A., Hakak, Y., Walker, J. R., Wiltshire, T., Orth, A. P., Vega, R. G., Sapinoso, L. M., Moqrich, A., *et al.* (2002). Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4465-4470.

Su, A. I., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Dimitrov, P., Lapp, H., Schultz, P. G., Powell, S. M., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Jr., and Hampton, G. M. (2001). Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 61, 7388-7393.

- Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., Zhang, J., Soden, R., Hayakawa, M., Kreiman, G., *et al.* (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6062-6067.
- Sun, Q. A., Wu, Y., Zappacosta, F., Jeang, K. T., Lee, B. J., Hatfield, D. L., and Gladyshev, V. N. (1999). Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. *J Biol Chem* *274*, 24522-24530.
- Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H., and *et al.* (1989). ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *Embo J* *8*, 757-764.
- Takahashi, M., Fujii, J., Teshima, T., Suzuki, K., Shiba, T., and Taniguchi, N. (1993). Identity of a major 3-deoxyglucosone-reducing enzyme with aldehyde reductase in rat liver established by amino acid sequencing and cDNA expression. *Gene* *127*, 249-253.
- Takebayashi, K., Akazawa, C., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1995). Structure and promoter analysis of the gene encoding the mouse helix-loop-helix factor HES-5. Identification of the neural precursor cell-specific promoter element. *J Biol Chem* *270*, 1342-1349.
- Thomas-Vaslin, V., Damotte, D., Coltey, M., Le Douarin, N. M., Coutinho, A., and Salaun, J. (1997). Abnormal T cell selection on nod thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57BL/6 athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 4598-4603.
- Thomas, U., Speicher, S. A., and Knust, E. (1991). The *Drosophila* gene *Serrate* encodes an EGF-like transmembrane protein with a complex expression pattern in embryos and wing discs. *Development* *111*, 749-761.
- Tseng, G. C., Oh, M. K., Rohlin, L., Liao, J. C., and Wong, W. H. (2001). Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res* *29*, 2549-2557.
- Tsugita, A., Kawakami, T., Uchida, T., Sakai, T., Kamo, M., Matsui, T., Watanabe, Y., Morimasa, T., Hosokawa, K., and Toda, T. (2000). Proteome analysis of mouse brain: two-dimensional electrophoresis profiles of tissue proteins during the course of aging. *Electrophoresis* *21*, 1853-1871.
- Uetz, P., and Hughes, R. E. (2000). Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol* *3*, 303-308.
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T. H., Uebel, S., and Tampe, R. (1997). Intracellular location, complex formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. *Eur J Biochem* *245*, 266-272.
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., and Kitajewski, J. (1996). Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development* *122*, 2251-2259.
- Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M., Pham, V. M., Garfield, M. K., and Ribeiro, J. M. (2003). Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol* *33*, 717-732.
- van Eck, M. M., Hoffer, M. J., Havekes, L. M., Frants, R. R., and Hofker, M. H. (1994). The apolipoprotein C2-linked (*Acl*) gene: a new gene within the mouse apolipoprotein e-c1-c2 gene cluster. *Genomics* *21*, 110-115.

- van Noort, M., Meeldijk, J., van der Zee, R., Destree, O., and Clevers, H. (2002a). Wnt signaling controls the phosphorylation status of beta-catenin. *J Biol Chem* 277, 17901-17905.
- van Noort, M., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2002b). Identification of two novel regulated serines in the N terminus of beta-catenin. *Exp Cell Res* 276, 264-272.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-12149.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 270, 484-487.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., *et al.* (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1991). A homolog of Drosophila Notch expressed during mammalian development. *Development* 113, 199-205.
- Weinmaster, G., Roberts, V. J., and Lemke, G. (1992). Notch2: a second mammalian Notch gene. *Development* 116, 931-941.
- Weisgraber, K. H., and Mahley, R. W. (1996). Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *Faseb J* 10, 1485-1494.
- Wharton, K. A., Johansen, K. M., Xu, T., and Artavanis-Tsakonas, S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-581.
- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., and Williams, K. L. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 13, 19-50.
- Wilkinson, D.G. (ed). 1992. *In Situ* Hybridization. A Practical Approach. Oxford University Press, New York.
- Wurst, W., Rossant, J., Prideaux, V., Kownacka, M., Joyner, A., Hill, D. P., Guillemot, F., Gasca, S., Cado, D., Auerbach, A., and *et al.* (1995). A large-scale gene-trap screen for insertional mutations in developmentally regulated genes in mice. *Genetics* 139, 889-899.
- Yoon, D. Y., Buchler, P., Saarikoski, S. T., Hines, O. J., Reber, H. A., and Hankinson, O. (2001). Identification of genes differentially induced by hypoxia in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 882-886.
- Young, T. L., Scavello, G. S., Paluru, P. C., Choi, J. D., Rappaport, E. F., and Rada, J. A. (2004). Microarray analysis of gene expression in human donor sclera. *Mol Vis* 10, 163-176.
- Zakany, J., Kmita, M., and Duboule, D. (2004). A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304, 1669-1672.
- Zammatteo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L., and Remacle, J. (2000). Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem* 280, 143-150.

ANHANG

Tabellen

Tabelle 12: Kandidatengene aus RNA-Expressionsanalyse von Embryonen Tag 11,5 *p. c.* des Genotyps*Dll1^{LacZ/LacZ} versus Dll1^{+/+}*

Hoch-reguliert in <i>Dll1</i> -Mutante				
Rang	Gensymbol	Genname	Expr.-Verhält.	Funktion
1	Ndrp1	N-myc downstream regulated gene 1	24,19	growth inhibitory role; mast cell activation
2	P4ha1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha 1	7,24	oxidoreductase activity, oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, 2-oxoglutarate as one donor, and incorporation of one atom each of oxygen into both donors...
3	D530020C15Rik	RIKEN cDNA D530020C15 gene	6,7	[pyruvate dehydrogenase (lipoamide)] kinase activity, ATP binding
4	Aldo1	aldolase 1, A isoform	5,87	fructose-bisphosphate aldolase activity, lyase activity
5	Hk2	hexokinase 2	5,57	ATP binding, catalytic activity...
6	Aldo1	aldolase 1, A isoform	4,66	fructose-bisphosphate aldolase activity, lyase activity
7	Slc16a3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	4,21	monocarboxylate porter activity, symporter activity...
8	Hig1	hypoxia induced gene 1	4,2	unbekannt
9	2410006H16Rik	RIKEN cDNA 2410006H16 gene	4,12	unbekannt
10	2310056P07Rik	RIKEN cDNA 2310056P07 gene	3,83	unbekannt
11	Ldh1	lactate dehydrogenase 1, A chain	3,58	L-lactate dehydrogenase activity, oxidoreductase activity...
12	Eno2	enolase 2, gamma neuronal	3,39	lyase activity, magnesium ion binding
13	Tpi	triosephosphate isomerase	3,37	isomerase activity, triose-phosphate isomerase activity...
14	Stc2	stanniocalcin 2	2,89	hormone activity, molecular_function unknown...
15	Gpi1	glucose phosphate isomerase 1	2,8	cytokine activity, glucose-6-phosphate isomerase activity...
16	Ldh1	lactate dehydrogenase 1, A chain	2,54	L-lactate dehydrogenase activity, oxidoreductase activity...
17	Mphosph6	M phase phosphoprotein 6	2,53	unbekannt
18	Pfk1	phosphofructokinase, liver, B-type	2,5	6-phosphofructokinase activity, ATP binding...
19	Asns	asparagine synthetase	2,45	asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) activity, ligase activity...
20			2,31	unbekannt
21	Bsg	basigin	2,29	unbekannt
22	Plekha2	pleckstrin homology domain-containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2	2,19	lipid binding, phosphatidylinositol binding...
23	9130210N20Rik	RIKEN cDNA 9130210N20 gene	2,18	transferase activity, transferase activity, transferring glycosyl groups...
24	Gas5	growth arrest specific 5	2,16	
25	Ndrp2	N-myc downstream regulated gene 2	2,16	
26	Pgam1	phosphoglycerate mutase 1	2,15	bisphosphoglycerate mutase activity, bisphosphoglycerate phosphatase activity...
27	Hexb	hexosaminidase B	2,14	beta-N-acetylhexosaminidase activity, hydrolase activity...

28	Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3-like	2,12	evtl. beteiligt an Apoptoseregulation
29	MG-26-10j13	unbekannt	2,07	unbekannt
30	Fkbp6	FK506 binding protein 6	2,06	FK506 binding, isomerase activity...
31	MG-12-286o23	unbekannt	2,03	unbekannt
32	Cars	cysteinyl-tRNA synthetase	2,02	ATP binding, cysteine-tRNA ligase activity...
Runter-reguliert in <i>DIII</i>-Mutante				
Rang	Gensymbol	Genname	Expr.-Verhält.	Funktion
1	MG-4-2p9	unbekannt	8,81	unbekannt
2	Hbb-b1	hemoglobin beta adult major chain	8,32	Hbb-b1 encodes a protein or proteins that contain n the following InterPro domains: Beta haemoglobin, Globin, Globin-like, Globin-related, and Myoglobin. GO inferences based on these domains imply that the gene product has oxygen binding activity.
3	Hba-a1	hemoglobin alpha, adult chain 1	7,71	Siehe oben
4	Hba-a1	hemoglobin alpha, adult chain 1	7,55	Siehe oben
5	Il6st	interleukin 6 signal transducer	7,13	regulation of Notch signaling pathway
6	IMAGE:5690976	unbekannt	7,10	unbekannt
7	Hbb-b1	hemoglobin beta adult major chain	7,08	Siehe oben
8	Hbb-b1	hemoglobin beta adult major chain	6,99	Siehe oben
9	Rhob	ras homolog gene family, member B	6,92	angiogenesis, apoptosis
10	Hba-a1	hemoglobin alpha, adult chain 1	6,77	Siehe oben
11	Slc4a1	solute carrier family 4 anion exchanger member 1	6,56	Band 3 anion transport protein; Transport and binding proteins
12	Hbb-b1	hemoglobin beta adult major chain	6,38	Siehe oben
13	Hbb-b1	hemoglobin beta adult major chain	6,25	Siehe oben
14	Eraf	erythroid associated factor	5,81	erythrocyte differentiation,
15	Car2	carbonic anhydrase 2	5,72	Amino acid biosynthesis
16	Grrp1	glycine/arginine rich protein 1	5,61	ubekannt
17	Gypa	glycophorin A	5,21	Translation; Erythrocyte; Sialic acid; Transmembrane; Glycoprotein
18	1110017I16Rik	1110017I16Rik	4,86	unbekannt
19	Hbb-b1	hemoglobin beta adult major chain	4,68	Siehe oben
20	Alas2	aminolevulinic acid synthase 2 erythroid	4,27	Amino acid biosynthesis; Acyltransferase; Pyridoxal phosphate; Transferase;
21	Mark3	MAP microtubule affinity-regulating kinase 3	3,93	Transferase; Serine/threonine-protein kinase; ATP-binding;
22	Car2	carbonic anhydrase 2	3,71	Amino acid biosynthesis
23	C1qtnf6	C1q and tumor necrosis factor related protein 6	3,37	unbekannt
24	Snn	stannin	2,77	unbekannt
25	BC025816	cDNA sequence BC025816	2,4	unbekannt
26	Nes	nestin	2,39	evtl. an Neurogenese beteiligt
27	Alad	aminolevulinate delta- dehydratase	2,39	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers

28	1700025G04Rik	1700025G04Rik	2,34	unbekannt
29	4930542G03Rik	4930542G03Rik	2,29	unbekannt
30	Spnb1	spectrin beta 1	2,07	barbed-end actin filament capping; actin binding
31	Hmbs	hydroxymethylbilane synthase	2,04	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers

Tabelle 13: Nach einer erweiterten, weniger stringenten Analyse zusätzlich erhaltene Kandidatengene. In der homozygoten *Txnrd1*-Mutante hoch-regulierte Gene in „rot“; runter-regulierte in „grün“. Alle Angaben bezüglich Gen-Namen und Funktionen stammen aus MGI-Datenbank.

Hoch-reguliert in <i>Txnrd1</i> -Mutante				
Rang	Gensymbol	Gen-ID	Expr.-Verhältnis	Funktion
1	2310043N10Rik	MGI:1914211	2,38 ± 0,60	unbekannt
2	Agt	MGI:87963	1,77 ± 0,66	Angiotensinogen / Serineprotease-Inhibitor / Blutdruckkontrolle, Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke, Schutz neuronaler Zellen vor Apoptose
3	Cirbp	IMAGE:30656047	1,60 ± 0,49	Durch Kälte induzierbares RNA-Bindeprotein; diurnale Expression von Cirbp im Nervensystem der Maus
Runter-reguliert in <i>Txnrd1</i> -Mutante				
Rang	Gensymbol	Gen-ID	Expr.-Verhältnis	Funktion
1	Txnrd1	MGI:1354175	1,87 ± 0,61	Thioredoxinreduktase 1 / Selenoprotein, bedeutende Rolle innerhalb des Thioredoxinsystems während der Entwicklung, cerebellare Hypoplasie in <i>Txnrd1</i> defizienten Mäusen
2	Zic1	MGI:106683	1,74 ± 0,42	Zinkfingerprotein, im Cerebellum exprimiert, Kontrolle der cerebellaren Entwicklung durch Regulierung der neuronalen Differenzierung, <i>Zic1</i> -Mutanten zeigen eine Hypoplasie des Cerebellums
3	1500012D20Rik	MGI:1925577	1,70 ± 0,51	unbekannt
4	unbekannt	AI853839	1,68 ± 0,53	unbekannt
5	unbekannt	unbekannt	1,73 ± 0,39	unbekannt
6	Mpp3	MGI:1328354	1,49 ± 0,28	Membranprotein, Palmitoyliert 3 (MAGUK p55), intrazelluläre Signalkaskade, Guanylatkinase
7	0610039D01Rik	IMAGE:5053934	3,61 ± 2,70	unbekannt
8	Grm8	MGI:1351345	1,76 ± 0,52	Glutamatrezeptor, Metabotropic 8 / Glutamatrezeptor, G-Protein gekoppelte Rezeptor Aktivität, Glutamatrezeptor gekoppelte Aktivität
9	Tulp4	MGI:1916092	1,57 ± 0,54	Tubby-ähnliches Protein 4, cytoplasmatische, gehört zur TUB-Familie, Expression im Cortex, genaue biologische Funktion bislang noch unbekannt
10	Chn2	MGI:1917243	1,64 ± 0,39	Chimerin (Chimaerin) 2
11	Sepw1	MGI:1100878	1,33 ± 0,26	Selenoprotein W, Muskel 1 / Selenoprotein, bindet Glutathionglutathione, Funktion in Oxidantenschutz
12	Adcy1	MGI:99677	1,42 ± 0,34	Adenylatcyclase 1, Membranprotein, cAMP Signalweg, assoziiert mit Neuroplastizität, wie Hippocampus und cerebraler Cortex

Tabelle 14: Kandidatengene aus RNA-Expressionsanalyse von Thymus von B6 gegen Thymus von C3H. Auswahl 22 Gene mit dem höchsten mittleren Expressionsverhältnis aus 50 signifikant differentiell exprimierten Genen. Expr.-Verhältnis: Expressionsverhältnis und Standardabweichung in allen 22 DNA-Chipexperimenten.

Hoch-reguliert in C3H					
Rang	Gensymbol	Genname	Gen-ID	Expr.-Verhältnis	Funktion
1	Ly6d	lymphozytisches Antigen 6-Komplex-Gen, Locus D	MGI:96881	5,53±1,46	Zelladhäsion und Zellaktivierung, T-Zellentwicklung
2	Ube4b	Ubiquitinierungsfaktor E4B, UFD2 Homolog, <i>S. cerevisiae</i>	MGI:96881	7,33±3,25	Ubiquitin-abhängiger Protein-Katabolismus
3	Erdr1	erythroider Differenzierungsregulator 1	MGI:238474 7	3,05±0,76	biologische, zelluläre und molekulare Funktion und Prozess

					unbekannt
4	Slc28a2	Natrium-Carrierfamilie 28, Natrium-gekoppelter Nukleosidtransporter, Mitglied 2	MGI:1913105	2,44±0,44	Purin-Nukleosidtransport, Natrium-Symporter Aktivität
5	5031415C07Rik	RIKEN cDNA 5031415C07 Gen	MGI:1926064	2,43±0,62	unbekannte Funktion
6	Nedd4l	in neuralen Vorläuferzellen exprimiert, in der Entwicklung runter-reguliertes 4-ähnliches Gen	MGI:1933754	2,16±0,48	Ubiquitinprotein, Ligaseaktivität, Proteinmodifikation, intrazellulär, human Nedd4l = mögliche Rolle in einer autosomal dominant vererbten orthostatischen hypotensischen Funktionsstörung im Menschen
7	Prss16	Serin Protease, 16 Thymus	MGI:1859181	1,72±0,28	Initiation der T-Zellentwicklung, Thymus
8	Unbekantes Gen	<i>Mus musculus</i> , adultes Männchen, olfaktorisches Gehirn cDNA, RIKEN volle Länge	AK032612	2,21±0,94	unbekannt

Hoch-reguliert in B6

Rang	Gensymbol	Genname	Gen-ID	Expr.-Verhältnis	Funktion
1	Supt16h	Suppressor vom Ty 16 Homolog, Thymus spezifisch	MGI:1890948	8,12±2,98	Translationselongationsfaktor - Aktivität, FACT 140 = humanes Homolog, koordinierte Expression von Thymus-spezifischen Genen durch Chromatin-Umgestaltung und Kontrolle der Transkription → bedeutende Rolle in der T-Zellentwicklung und VDJ Umordnung
2	Hsd3b3	Hydroxysteroid dehydrogenase-3, delta5-3-beta	MGI:96235	7,63±1,75	C21-Steroidhormon Biosynthese, 3-beta-hydroxy-delta5-Steroid-dehydrogenaseaktivität
3	Ngfg	Nervenzwachstumsfaktor, gamma	MGI:97322	5,58±2,27	Proteolyse, Peptidolyse und Wachstumsfaktoraktivität
4	Klk8	Kallikrein 8	MGI:892018	5,73±2,86	Proteolyse, Peptidolyse und Hydrolaseaktivität
5	Arhb	Ras-Homolog Genfamilie, Mitglied B	MGI:107949	4,38±1,86	Zellwachstum und/oder Aufrechterhaltung, Rho-Protein Signaltransduktion
6	1110017I16Rik	RIKEN cDNA 1110017I16 Gen	MGI:1915777	4,30±1,66	unbekannte Funktion
7	Nup155	Nukleoporin 155	MGI:2181182	3,25±0,92	nukleoplasmatischer Transport
8	Itga10	Integrin, alpha 10	MGI:2153482	3,75±1,19	Kollagen-bindendes Integrin, unbekannte Funktion
9	1300019N10Rik	RIKEN cDNA 1300019N10 Gen	MGI:1919017	3,69±1,43	unbekannte Funktion
10	Cap1	CAP, Adenylatcyclase-assoziiertes Protein 1, Hefe	MGI:88262	4,12±1,10	zelluläre Morphogenese
11	Glo1	Glyoxalase 1	MGI:95742	3,20±0,73	Kohlenhydratmetabolismus, Laktatylglutathionlyase Aktivität
12	Gamt	Guanidinacetatmethyltransferase	MGI:1098221	3,40±0,99	Guanidinacetatmethyltransferase, GAMT katalysiert den letzten Schritt des Biosynthesewegs zu Creatin (Cr), den Transfer einer Methylgruppe von S-adenosylmethionin zu Guanidinacetat –zellulärer Energiemetabolismus und Methylgruppenmetabolismus
13	9230110M18Rik	RIKEN cDNA 9230110M18 Gene	MGI:1924705	4,06±1,51	unbekannte Funktion
14	Apg12l	autophagisches 12-ähnliches Gen <i>S. cerevisiae</i>	MGI:1914776	3,22±1,39	autophagische Vakuolenbildung

Tabelle 15: Identifizierung von differentiell exprimierten Proteinen von Leber und Niere und Vergleich mit den Transkripten der RNA-Expressionsprofilanalyse. Proteine, die entweder in der Leber oder in der Niere reguliert sind, wurden mittels Massenspektroskopie (Spalte "Protein Acc. No.") analysiert. Die Proteinsequenzen wurden verwendet, um offizielle "Gen Name", "Gen Symbole" und "MGI Gen Ids" durch das Vergleichen (*BLASTP*) gegen die SwissProt/TrEMBL-Mausdatenbank unter Verwendung des *WU-BLAST 2.0* Suchprogramms auf MGI 2,96 zu identifizieren. Die korrespondierenden DNA-Proben auf dem Microarray wurden durch das Vergleichen der kodierenden Sequenz jedes Gens gegen die Datenbank aller Probensequenzen (Spalte "Lion ID") identifiziert. Gene, die mit " / " markiert sind, hatten keine korrespondierende Nukleotidsequenz in dem MausarrayTAG-Probenaset. Fett gedruckte Nummern in der Spalte "Transkript Expression" zeigen den Rang einer bestimmten Probe an. Die Rangfolge wurde entsprechend dem minimalsten Verhältnis aus 16 DNA-Chip-Hybrdisierungsexperimenten erstellt. Rote Nummer deutet auf eine reproduzierbare Hoch-Regulation in der Leber und grüne Nummer auf eine Hoch-Regulation in der Niere hin. Die "molekulare Funktion", "Biologischer Prozess" und die "Zelluläre Komponente" sind wie die korrespondierenden Acc Ids in MGD der Gen-Ontology Nomenklatur (nicht alle Einträge sind gezeigt um Redundanz zu reduzieren) folgend, kommentiert. Die Gene, die mit " / " in diesen beiden Spalten gekennzeichnet sind hatten zur Zeit der Analyse keine funktionelle Annotierung (Mijalski et al. 2005).

	Gene Symbol	Gene Name	MGI ID or GenBank	Protein Acc. No.	Lion ID	Transcript Expression	Molecular Function	Biological Process	Cellular Component
Liver									
pH 4-7	Rad23b	RAD23b homolog	MGI:105128	6679607	MG-3-49e4	not found in 11; 1,14 to 2,53 in others	/	DNA repair / nucleotide-excision repair / response to DNA damage stimulus	nucleus
	Krt1-18	keratin complex 1, acidic, gene 18	MGI:96692	(2x) 2119205	MG-26-224c18	not found in 5; 2,47 - 7,45	structural constituent of cytoskeleton	cytoskeleton organization and biogenesis	intermediate filament / kinesin complex
	Cai	calcium binding protein, intestinal	MGI:104864	6753240	MG-12-192a13 MG-6-7k4	#892 #414	electron transporter activity / isomerase activity	electron transport	endoplasmic reticulum / extracellular space
	Cps1	carbamoyl-phosphate synthetase 1	MGI:891996	(3x) 28479079	MG-15-234f16	#213	carbamoyl-phosphate synthase (ammonia) activity	/	/
		not known	gb BC026366	14756939	MG-14-40f1	insufficient data	/	/	/
	Rnf20	ring finger protein 20	MGI:1925927	27714487	MG-6-92k9	not diff. expressed	/	/	/
	Hal	histidine ammonia lyase	MGI:96010	26324922	MG-68-80g16	#146	ammonia lyase activity / histidine ammonia-lyase activity	biosynthesis / histidine catabolism and metabolism	cytoplasm
	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	MGI:99600	6753036	MG-77-2c3	#424	aldehyde dehydrogenase (NAD) activity / ATP binding / oxidoreductase activity	metabolism	mitochondrion
	Gpt1	glutamic pyruvic transaminase 1, soluble	MGI:95802	111345	MG-4-3i8	not found in 8; 2,27 to 4,11 in others	alanine transaminase activity	/	/
	Dbt	dihydrolipamide branched chain transacylase E2	MGI:105386	6753610	/	/	acyltransferase activity / protein binding	metabolism	mitochondrion
	Scp2	sterol carrier protein 2, liver	MGI:98254	17390903	MG-6-53e24 MG-8-1i7	#255 #349	lipid binding / sterol carrier activity / sterol carrier protein X-related thiolase activity	acyl-CoA metabolism / peroxisome organization and biogenesis / transport	mitochondrion / peroxisome
	Agmat	agmatine ureohydrolase (agmatinase)	MGI:1923236	20848362	/	/	/	/	extracellular space
	Nudt7	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7	MGI:1914778	27754009	MG-15-126a14	#68	acetyl-CoA hydrolase activity	acetyl-CoA catabolism / coenzyme A catabolism	peroxisome
	Mup1, Mup2	major urinary protein 1 or 2	MGI:97233 MGI:97234	8569601, 13654245	MG-71-1o4 MG-13-113p17 MG-13-6p18 MG-76-1f16	#32 #5 #41 #30	pheromone binding / transporter activity	immediate hypersensitivity response / transport	/
	Actr3	ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast)	MGI:1921367	23956222	MG-16-239p7 MG-4-145i14	not diff. expressed not diff. expressed	/	cell motility	Arp2/3 protein complex / cytoskeleton
pH 6-11	Fabp1	fatty acid binding protein 1, liver	MGI:95479	8393343	MG-11-2h21	#14	fatty acid and lipid binding / transporter activity	transport	/
	Car3	carbonic anhydrase 3	MGI:88270	(3x) 10717134	MG-15-86j2 MG-8-26a9	#56 #16	carbonate dehydratase activity / lyase activity / zinc ion binding	one-carbon compound metabolism	/
	Bhmt	betaine-homocysteine methyltransferase	MGI:1339972	7709990	MG-8-20o20	#17	homocysteine S-methyltransferase activity	methionine biosynthesis	/
	Hpd	4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	MGI:96213	1346309	MG-3-109h3	#78	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity / oxidoreductase activity / quercetin 2,3-dioxygenase activity	aromatic amino acid family metabolism / phenylalanine catabolism / tyrosine catabolism	/
	Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3	MGI:95856	6754080	MG-3-82j21	#346	transferase activity	glutathione conjugation reaction	/
	Gstp2	glutathione S-transferase, pi 2	MGI:95865	10092608	MG-6-19c10	#49	glutathione transferase activity	glutathione conjugation reaction	/
	Qdpr	quinoloid dihydropteridine reductase	MGI:97836	21312520	MG-3-206m19	#588	6,7-dihydropteridine reductase activity / oxidoreductase activity	metabolism / tetrahydrobiopterin biosynthesis	/
	Arg1	arginase 1, liver	MGI:88070	7106255	MG-13-69p4 MG-68-114i7	#57 #106	arginase activity / catalytic activity / hydrolase activity / manganese ion binding	arginine catabolism and metabolism / urea cycle	/
	Dmgdh-pending	dimethylglycine dehydrogenase precursor	MGI:1921379	20806145	MG-12-284o10	#230	oxidoreductase activity	protein targeting	mitochondrion
	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	MGI:101939	1083370	MG-11-1e11 MG-12-130c13	(no data) #153	hydroxymethylglutaryl-CoA synthase activity / transferase activity	acetyl-CoA metabolism / cholesterol biosynthesis	mitochondrion
	Hgd	homogentisate 1, 2-dioxygenase	MGI:96078	7549763	MG-12-23i12	#435	homogentisate 1,2-dioxygenase activity / oxidoreductase activity	phenylalanine catabolism / tyrosine catabolism and metabolism	/
	Uox	urate oxidase	MGI:98907	6678509	/	/	oxidoreductase activity / urate oxidase activity	purine base metabolism	peroxisome
Kidney									
pH 4-7	Vil	villin	MGI:98930	15929678, 6678573	MG-13-93h18	1,08 to 6,38 in 11 chips; not found in 5)	actin binding	cytoskeleton organization and biogenesis	brush border / cytoskeleton
	Atp6v1b2	ATPase, H+ transporting, V1 subunit B, isoform 2	MGI:109618	19705578	MG-6-62h11	#45	ATP-binding and phosphorylation-dependent chloride channel activity / hydrogen ion transporter activity / hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism / hydrolase activity	ATP biosynthesis / hydrogen, proton transport	proton-transporting two-sector ATPase complex
	Arbp	acidic ribosomal phosphoprotein P0	MGI:88066	6671569	MG-26-143a16	#321	structural constituent of ribosome	protein biosynthesis / translational elongation	intracellular / ribosome
	Dnahc11	dynein, axonemal, heavy chain 11	MGI:1100864	27670711	MG-15-272p14	not diff. expressed	ATP binding / cysteine-type endopeptidase activity / dynein ATPase activity / microtubule motor activity	ciliary/flagellar motility / determination of left/right asymmetry / proteolysis and peptidolysis / transport	axonemal dynein complex / cilium / dynein complex / mitochondrial inner membrane
	Mtx2	metaxin 2	MGI:1859652	13879331	MG-6-15i11	not diff. expressed	protein transporter activity	intracellular protein transport	mitochondrion / outer membrane
	Tpk1	thiamin pyrophosphokinase	MGI:1352500	7305589	/	/	kinase activity / thiamin diphosphokinase activity / transferase activity	thiamin metabolism	/
	Ak1	adenylate kinase 1	MGI:87977	13959400	MG-6-11e3	not diff. expressed	adenylate kinase activity / ATP binding / transferase activity	ATP metabolism / cell cycle arrest	cytoplasm
	Gpx3	glutathione peroxidase 3	MGI:105102	15011841	/	/	glutathione peroxidase activity / oxidoreductase activity / peroxidase activity	response to oxidative stress	extracellular space
pH 6-11	Akr1a4	aldo-keto reductase family 1, member A4 (aldehyde reductase)	MGI:1929955	(2x) 10946870	MG-3-29k1 MG-8-32a18	#82 #157	alcohol dehydrogenase (NADP) activity / aldehyde reductase activity / oxidoreductase activity	/	/
	Fh1	fumarate hydratase 1	MGI:95530	28483570	MG-12-230c9	from 1,01-2,5 in all experiments	catalytic activity / fumarate hydratase activity / lyase activity	fumarate metabolism / tricarboxylic acid cycle	mitochondrion / TCA cycle enzyme complex
	Oxct	3-oxoacid CoA transferase	MGI:1914291	18266680	MG-6-65c15	#16	3-oxoacid CoA-transferase activity	succinyl-CoA metabolism	extracellular space / mitochondrion
	Ldh1	lactate dehydrogenase 1, A chain	MGI:96759	6754524	MG-8-77k6	from 1,38-4,11 in 15 chips; down in one chip	L-lactate dehydrogenase activity / oxidoreductase activity	glycolysis	/
	Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1	MGI:1915077	19527258	/	/	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (acylating) activity / oxidoreductase activity	metabolism	mitochondrion
	Acox1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	MGI:1330812	6429156	MG-12-196n23 MG-9-25j7 MG-16-143o22	up in 14 chips up in 15, no data in one chip up in 11 chips	acyl-CoA oxidase activity / oxidoreductase activity	electron transport / fatty acid beta-oxidation / fatty acid metabolism / spermatogenesis	peroxisome
	Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	MGI:95482	6753814	MG-3-75e16	#423	catalytic activity / DNA binding / fumarylacetoacetase activity / hydrolase activity	aromatic amino acid family metabolism / phenylalanine catabolism / regulation of transcription, DNA-dependent	nucleus
	Tpi	triosephosphate isomerase	MGI:98797	6678413	MG-6-1m5	#247	isomerase activity / triose-phosphate isomerase activity	fatty acid biosynthesis / gluconeogenesis / glycolysis	/

Sequenzen

MSD-B-Sequenz:

cagggactgt tttgccacg gccatggggg tgtgccttag ggggtgcagt atctttgaagcctccatt gtctataat aaacaggttt
tttaaaaagt gggatctaac cctgccttc tcacctcagc ctgagatt atacacatgg cttttgggt aactcttga ttgtctgtga
gttggcgatg acgacgtgaa gtgcagaaat tcctgtgat tctgaaactt tgaaagtgt tgggagacag ggtagcagta
ggcaggctgg gtcacagaa aaggagctgt aatttcagtt gccagatggc ccaacacaga tgattctgcc cagtaactgc tagattctg
ttagcagtgt ttctctgggc atgcgaagtt ttctctctt tctgtgcatt atatacatct tgctccagat actggcctaa atgatcaagc
tactctgcca ggacagggt cattctcacc aacaggacag caacacctac agtgaggaca cctgtcaggt acaccctagg
ggctgtgcta caatcaaagg aacactagct ccaagaatca cacctcgga ttctaatgaa gctgcctagg tgggtgggggt
ggagtaaaga ggcccctcta aagatgggaa tatacagctc atggcatgct caacacaaag ctaggtgcta agtcagagac
tatactcca ttactttc tctggagctt gtaaccagg gagccgtta ggtaattcat tgtgatact gtgtcctggg ccctccaat
aaactcatt ccctaaaaa aaaaaaaaaag aaaaaaaga aaacnaaagt tctagtgtct gatggatgtg taaaaa

Deletion des 5' liegenden 4er-Motivs:

tattatacacatggcttttggttaactcttgattgtctgtgagttggcgatgacgacgtgaagtgcagaaattcctgttgattctgaaactttgaaagt
gttgggagacagggtagcagtaggcaggctgggtcatcagaaaaggagctgaatttcagttgccag

Deletion des 3' liegenden 2er-Motivs:

ccctccaataaactcatttcccttaaaaaaaaaaaaaaagaaaaaaagaaaacnaaagttcta